



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

***“Terapia antitumoral contra glioblastoma con Gas1 secretable y
células troncales neurales”***

Tesis que presenta

Adolfo López Ornelas

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

En la especialidad de

Farmacología

Director de la tesis:

Dr. José Segovia Vila

México, Distrito Federal.

Mayo, 2013

Agradecimientos

A mis padres y mis hermanas.

Al Dr. José Segovia Vila.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (No. de registro 206882).

Al Instituto Carlos Slim de la Salud (Folio ICSS: S0922404).

A la Q.F.I. Paula Vergara Zubillaga.

Al Sr. Rubén Sánchez Islas.

A mis amigos y compañeros de laboratorio.

A las Doctoras Anayansi Molina Hernández y Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez.

A los Doctores Daniel Martínez Fong, Jorge Sánchez Rodríguez y José Vázquez Prado.

A mis amigos Alan, Carlos y Mario.

Contenido

Lista de tablas	1
Lista de figuras	1
Abreviaturas	4
Resumen	7
Abstract	8
Introducción	9
<i>Gliomas</i>	9
<i>Incidencia</i>	9
<i>Clasificación</i>	9
<i>Factores de riesgo</i>	10
<i>Presentación clínica</i>	12
<i>Diagnóstico</i>	12
<i>Tratamiento</i>	14
<i>Terapia génica</i>	15
<i>Transferencia génica</i>	17
<i>Genes integrados en cromosomas</i>	17
<i>Genes no integrados</i>	18
<i>Métodos de transferencia génica</i>	19
<i>Sistemas de vectores</i>	19
<i>Vectores no virales</i>	19
<i>Vectores virales</i>	20
<i>Vectores Adenovirales</i>	23
<i>Vectores Adenoasociados</i>	25
<i>Vectores Retrovirales</i>	25
<i>Vectores Lentivirales</i>	26
<i>Terapia génica en enfermedades monogénicas</i>	27
<i>Terapia génica en cáncer</i>	28

<i>Estrategias en terapia génica del cáncer.....</i>	<i>28</i>
<i>Terapia génica en glioblastoma.....</i>	<i>30</i>
<i>Gas1 como proteína terapéutica.....</i>	<i>34</i>
<i>Relevancia de un vector lentiviral de expresión regulable con tGas1.....</i>	<i>43</i>
Justificación.....	45
Hipótesis.....	47
Objetivos.....	48
Generales.....	48
Específicos.....	48
<i>In vitro</i>	48
<i>In vivo</i>	49
CTNs.....	49
Metodología.....	50
Línea celular de GBM.....	50
Cuantificación de la viabilidad celular.....	50
Infección de células C6 con los lentivirus con el transgén tGas1.....	50
Incorporación de BrdU (Proliferación celular).....	51
Ensayo de apoptosis.....	52
Obtención de una línea estable de C6 con un elemento represor de la expresión (TR) y la forma secretable de Gas1 (tGas1).....	53
Obtención de la dosis de Tetraciclina inductora de la expresión de tGas1 en la línea C6 estable.....	53
Cuantificación de apoptosis y disminución de la proliferación celular en la línea C6 estable.....	54
Comprobación de la expresión del transgén y de la proteína.....	54
RT-PCR.....	54
Western blot.....	56
Inmunocitoquímica.....	57
Número de copias virales de la línea C6 estable por técnica de Southern blot.....	58

<i>Efecto in vivo del lentivirus con tGas1.....</i>	<i>58</i>
<i>Expresión regulable de tGas1 por Tetraciclina en un modelo in vivo de glioblastoma.....</i>	<i>59</i>
<i>Uso de CTNs como vehículo de una forma secretable y regulable de tGas1.....</i>	<i>60</i>
<i>Línea de CTNs.....</i>	<i>60</i>
<i>Infección de las CTNs con un retrovirus con la Proteína Verde Fluorescente (GFP).....</i>	<i>60</i>
<i>Citometría de flujo.....</i>	<i>61</i>
<i>Células productoras del retrovirus y construcción retroviral.....</i>	<i>61</i>
<i>Infección de las CTNs verdes fluorescentes con dos lentivirus: uno con la secuencia del TR y otro con la secuencia de tGas1.....</i>	<i>62</i>
<i>Protocolo de construcción lentiviral.....</i>	<i>64</i>
<i>Infección lentiviral en las CTNs.....</i>	<i>65</i>
<i>Elaboración de una línea estable de células C6 con la Proteína Roja Fluorescente.....</i>	<i>66</i>
<i>Viabilidad de las CTNs y las células C6.....</i>	<i>66</i>
<i>Proliferación de las CTNs (productoras de tGas1) y de las células C6 (Receptoras de tGas1).....</i>	<i>67</i>
<i>Apoptosis en las CTNs y en las células C6.....</i>	<i>67</i>
<i>Implantación intracraneal de células C6 y CTNs en ratones desnudos.....</i>	<i>67</i>
<i>Valoración del volumen tumoral.....</i>	<i>69</i>
<i>Ganancia ponderal.....</i>	<i>69</i>
<i>Curva de supervivencia Kaplan-Meier.....</i>	<i>70</i>
<i>Análisis estadísticos.....</i>	<i>70</i>
Resultados.....	71
<i>In vitro.....</i>	<i>71</i>
<i>La sobreexpresión de tGas1 en células de glioblastoma, mediada por infección, disminuye la proliferación celular.....</i>	<i>71</i>
<i>La sobreexpresión de tGas1 en células de glioblastoma induce apoptosis.....</i>	<i>71</i>
<i>La expresión de tGas1 es regulable in vitro.....</i>	<i>73</i>

<i>Número de copias virales en la línea C6 estable.....</i>	<i>75</i>
<i>El medio de cultivo con tGas1 inmunodepletado no afecta la viabilidad celular...75</i>	
<i>In vivo.....</i>	<i>77</i>
<i>La sobreexpresión de tGas1 en glioblastomas implantados disminuye su crecimiento.....</i>	<i>77</i>
<i>La expresión de tGas1 en un modelo in vivo de glioblastoma es regulable y conserva su efecto antitumoral.....</i>	<i>79</i>
<i>Uso de CTNs como vehículo de tGas1 hacia glioblastomas.....</i>	<i>80</i>
<i>In vitro.....</i>	<i>80</i>
<i>Elaboración de una línea estable de células C6 con la Proteína Roja Fluorescente.....</i>	<i>80</i>
<i>Obtención de una línea estable de células ReNcell (CTNs) que expresan la Proteína Verde Fluorescente.....</i>	<i>81</i>
<i>Obtención de una línea estable de células ReNcell de expresión regulable que expresan la GFP, un elemento represor de la expresión (TR) y tGas1.....</i>	<i>81</i>
<i>La línea estable de CTNs, ReNcell-GFP/tGas1/TR, expresa tGas1 de una manera regulable mediada por Tetraciclina.....</i>	<i>82</i>
<i>tGas1 producida por las CTNs disminuye la viabilidad celular de ellas mismas y de células de glioblastoma.....</i>	<i>84</i>
<i>tGas1 disminuye la proliferación celular de las CTNs y de las células de glioblastoma.....</i>	<i>86</i>
<i>tGas1 induce apoptosis tanto en las CTNs como en las células de glioblastoma.....</i>	<i>86</i>
<i>In vivo.....</i>	<i>88</i>
<i>Migración desde el hemisferio cerebral contralateral de las CTNs hacia un glioblastoma implantado.....</i>	<i>88</i>
<i>tGas1 puede ser transportado por las CTNs hacia un glioblastoma implantado y conservar su efecto inhibidor tumoral.....</i>	<i>92</i>

<i>tGas1 disminuye el estado caquético en ratones con glioblastoma.....</i>	<i>94</i>
<i>tGas1 mejora la supervivencia en ratones con glioblastoma.....</i>	<i>95</i>
Discusión.....	98
Conclusiones.....	105
Perspectivas.....	106
Bibliografía.....	107

Lista de tablas

<i>Tabla 1. Vectores no virales.....</i>	<i>19</i>
<i>Tabla 2. Vectores virales.....</i>	<i>21</i>
<i>Tabla 3. Ensayos clínicos empleando terapia génica suicida.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabla 4. Ensayos clínicos empleando terapia génica con citocinas.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabla 5. Ensayos clínicos empleando virus oncolíticos.....</i>	<i>31</i>

Lista de figuras

<i>Figura 1. Representación esquemática de la utilización de CTNs como vehículo de transgenes con efecto antitumoral.....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 2. Secuencia de aminoácidos de Gas1.....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 3. GFRα1-4 y Gas1.....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 4. Gas1 interviene en la vía de señalización de Ret.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 5. Gas1 y Shh.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 6. Representación esquemática de las diferentes formas de Gas1.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 7. El efecto supresor en la proliferación en las células C6 transfectadas es mayor con Gas1.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 8. Expresión de Gas1 y tGas1 en las células C6 infectadas.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 9. Presencia de la proteína tGas1 en células C6 transfectadas.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 10. tGas1, con y sin epítotope V5, en el medio condicionado disminuye la viabilidad celular.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 11. tGas1 disminuye la viabilidad celular de manera autocrina y paracrina.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 12. Obtención del plásmido de construcción lentiviral.....</i>	<i>63</i>
<i>Figura 13. Esquema del protocolo en el modelo in vivo de GBM usando CTNs.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 14. La infección de células C6 con los lentivirus que expresan las formas secretables de Gas1 (tGas1) reducen la proliferación celular.....</i>	<i>72</i>

<i>Figura 15. tGas1 y tGas1-V5 se expresaron en las células C6 infectadas.....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 16. tGas1 induce apoptosis.....</i>	<i>73</i>
<i>Figura 17. La expresión de tGas1 es regulada por Tetraciclina en una línea C6 estable con el TR y tGas1.....</i>	<i>74</i>
<i>Figura 18. Número de copias virales en la línea C6 estable.....</i>	<i>75</i>
<i>Figura 19. tGas1 está presente en el medio condicionado de la línea C6 estable tratada con Tetraciclina e inhibe la viabilidad celular.....</i>	<i>76</i>
<i>Figura 20. Ejemplo representativo del efecto inhibidor tumoral in vivo de tGas1.....</i>	<i>78</i>
<i>Figura 21. Efecto in vivo de tGas1.....</i>	<i>78</i>
<i>Figura 22. Expresión regulable in vivo de tGas1 por Tetraciclina y su efecto antitumoral... </i>	<i>79</i>
<i>Figura 23. Células C6 estables con la PRF (C6-pDsRed1).....</i>	<i>80</i>
<i>Figura 24. Líneas de CTNs estables con la GFP.....</i>	<i>82</i>
<i>Figura 25. La expresión de tGas1 en la línea estable ReNcell-GFP/tGas1/TR es regulable con Tetraciclina.....</i>	<i>83</i>
<i>Figura 26. tGas1 sólo se expresa en la línea estable ReNcell-GFP/tGas1/TR en la presencia de Tetraciclina.....</i>	<i>84</i>
<i>Figura 27. tGas1 producida por las CTNs disminuye la viabilidad celular de estas mismas y de células C6 en cultivos independientes.....</i>	<i>85</i>
<i>Figura 28. tGas1 disminuye la proliferación celular de manera autocrina y paracrina.....</i>	<i>87</i>
<i>Figura 29. tGas1 induce apoptosis de una manera autocrina y paracrina.....</i>	<i>87</i>
<i>Figura 30. Las células C6-pDsRed1C6 forman un tumor intracerebral.....</i>	<i>89</i>
<i>Figura 31. Las células ReNcell-GFP migran hacia un tumor desarrollado por el xenoinplante de células C6.....</i>	<i>89</i>
<i>Figura 32. Las células ReNcell-GFP/tGas1/TR migran hacia un tumor desarrollado por el xenoinplante de células C6.....</i>	<i>90</i>
<i>Figura 33. Las células ReNcell-GFP/tGas1/TR que expresan tGas1 migran hacia un tumor desarrollado por el xenoinplante de células C6.....</i>	<i>91</i>
<i>Figura 34. Migración preferencial de las CTNs hacia un GBM.....</i>	<i>91</i>

Figura 35. tGas1 transportado por las CTNs conserva su efecto antitumoral en un modelo in vivo e intracerebral de GBM.....93

Figura 36. tGas1 sólo se detectó en los tumores tratados con la línea ReNcell-GFP/tGas1/TR y que recibió Tetraciclina.....94

Figura 37. tGas1 incrementa la ganancia ponderal en ratones desnudos con GBM.....95

Figura 38. tGas1 aumenta la supervivencia de ratones desnudos con GBM.....96

Abreviaturas

aa: Aminoácido.

AAV: Vectores adenoasociados.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario.

Akt: Homólogo humano del oncogén viral *v-akt*.

ANOVA: Análisis de varianza.

ARN: Ácido ribonucleico.

BrdU: Bromodesoxiuridina.

CBTRUS: *Central Brain Tumor Registry of the United States*.

CMV: Citomegalovirus.

cPPT: Tracto de Polipurinas.

CTNs: Células Troncales Neurales.

DAPI: Diamino-2-fenilindol.

DMEM: *Dulbecco Modified Eagle's Medium*.

DMSO: Dimetil sulfóxido.

dNTP: *Deoxyribonucleoside triphosphate*.

EE.UU.: Estados Unidos de América.

EGF: Factor de Crecimiento Epidermal.

EGFR: Receptor del EGF.

Gas1: Growth arrest-specific1.

GBM: Glioblastoma multiforme.

GDNF: Factor de Crecimiento Derivado de células Gliales.

GFAP: Proteína Glial Fibrilar Acídica.

GFP: Proteína Verde Fluorescente.

GFR α : Receptor para la familia del GDNF.

Gli1: *Glioma-associated oncogene homolog 1*.

GM-CSF: Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos.

GPI: Glicosilfosfatidilinositol.

Gy: Gray.

HEK: Células de Riñón Embrionarias Humanas.

HGF: Factor de Crecimiento de Hepatocitos.

HSV-TK: Timidina Cinasa del Virus Herpes Simplex.

IDH1: Isocitrato Deshidrogenasa1.

IFN: Interferón.

IL: Interleucina.

ip: Intraperitoneal.

IRM: Imagen por Resonancia Magnética.

IRMF: Imagen por Resonancia Magnética Funcional.

it: Intratumoral.

ITRs: *Inverted Terminal Repetitions*.

kb: Kilobases.

kDa: Kilodaltones.

LacZ: Gen de la β -galactosidasa.

LTRs: *Long Terminal Repeats*.

MGMT: O-6-Metilguanina-ADN Metiltransferasa.

MOI: *Multiplicity of Infection*, Múltiplo de Infección.

MoMLV: Virus de la Leucemia Murina de Moloney.

NIH: *National Institutes of Health*.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

ORF: Marco de lectura abierto.

pb: Pares de bases.

PDGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas.

PI3K: Fosfolinositida-3-Cinasa.

PLC: Fosfolipasa C.

PRF: Proteína Roja Fluorescente.

PTEN: Homólogo de la Fosfatasa y Tensina.

pv: Partículas virales.

RT: Repeticiones terminales.

SAGARPA: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

SFB: Suero Fetal Bovino.

Shh: Sonic hedgehog.

SICS: Síndrome de Inmunodeficiencia Combinada Severa.

Smo: *Smoothened*.

SNC: Sistema Nervioso Central.

S-TRAIL: Ligando Inductor de Apoptosis Relacionado al Factor de Necrosis Tumoral, en su forma Secretable.

TC: Tomografía Computarizada Contrastada.

TdT: *Deoxynucleotidyl transferase*.

Tet: Tetraciclina.

tGas1: Secuencia truncada de Gas1 (forma secretable).

TR: Transgén represor.

VEGFR: Receptor del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular.

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

WPRE: *Woodchuck Posttranscriptional Regulatory Element*.

Resumen

El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor cerebral más frecuente y mortal, teniendo una sobrevida promedio de 15 meses posterior al diagnóstico. Actualmente, ninguna de las terapias existentes ha logrado mejorar la sobrevida de estos pacientes. Por esta razón, nuevos enfoques y moléculas terapéuticas deben ser investigados.

Gas1 es una proteína expresada en múltiples órganos de mamífero y su sobreexpresión en GBMs induce arresto del ciclo celular y apoptosis. Está anclada a la membrana celular por una molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI) y su extremo amino terminal es el responsable de su función.

En este proyecto, se generó una forma soluble de Gas1 (tGas1), la cual no tiene adherida el ancla GPI. Se demostró que esta proteína es funcional y que también induce arresto del ciclo celular y apoptosis en células de GBM, de una manera autocrina y paracrina. También, se generó una línea estable de células de GBM que expresa de manera regulada tGas1. Por otro lado, se observó que la sobreexpresión de tGas1, ya sea por la aplicación de un lentivirus o por parte de la línea estable de GBM, en un modelo *in vivo* de GBM tiene un efecto antitumoral. Como nuevo abordaje terapéutico contra el GBM, se modificaron genéticamente Células Troncales Neurales (CTNs), las cuales expresaron de manera regulable tGas1, y fueron empleadas como vehículo de la proteína hacia un GBM implantado intracranealmente en ratones desnudos. tGas1 tuvo un efecto antitumoral, aumentó la supervivencia y mejoró el estado general de los ratones con GBM. Interesantemente, tGas1 también indujo arresto del ciclo celular y apoptosis en las CTNs.

Este trabajo plantea una terapia génica *ex vivo* empleando CTNs y la forma secretable y regulable de Gas1 para el tratamiento de los GBMs.

Abstract

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and deadly brain tumor, with a median survival of 15 months after diagnosis. Currently, none of the existing therapies has improved the survival of these patients. For this reason, new approaches and therapeutic molecules should be investigated.

Gas1 is a protein expressed in multiple organs of mammalian and its overexpression in GBMs induces cell cycle arrest and apoptosis. It is anchored to the cell membrane by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) molecule, and its amino terminus is responsible for its function.

In this project, we generated a soluble form of Gas1 (tGas1), which has not attached the GPI anchor. It was demonstrated that this protein is functional and also induces cell cycle arrest and apoptosis of GBM cells, in both autocrine and paracrine manner. It was also generated a stable line of GBM cells, which expresses tGas1 in a regulated manner. Furthermore, it was observed that overexpression, either by the application of a lentivirus or by GBM stable line, of tGas1 in an *in vivo* model of GBM had an antitumor effect. As new therapeutic approach against GBM, were genetically engineered Neural Stem Cells (NSCs), which expressed tGas1 in a regulated manner, and were used as a vehicle for the protein to a GBM intracranially implanted into nude mice. tGas1 had an antitumor effect, increased the survival and improved the overall health of mice with GBM. Interestingly, tGas1 also induced cell cycle arrest and apoptosis of NSCs.

This work focuses on an *ex vivo* gene therapy using NSCs and the secretable and regulable form of Gas1 for the treatment of GBMs.

Gliomas

Incidencia

De acuerdo con datos de los EE.UU. la incidencia de tumores primarios cerebrales y de la médula espinal es de 18.7 por cada 100,000 habitantes y los tumores malignos tienen una incidencia de 7.2 por cada 100,000 habitantes. La incidencia de estos últimos varía según la edad: entre los 0 y 4 años es de 5 por cada 100,000 habitantes, entre los 15 y 45 años es de 15 por cada 100,000 habitantes y entre los 65 y 74 años, donde se observa la mayor incidencia, es de 56 por cada 100,000 habitantes (CBTRUS 2010).

El GBM es el más común y mortal de los tumores primarios del Sistema Nervioso Central (SNC) y tiene una incidencia de 5 a 20 casos por cada 100,000 habitantes. El GBM representa del 60 al 75% de los gliomas malignos, el astrocitoma anaplásico representa del 10 al 15% y el oligodendroglioma anaplásico y oligoastrocitoma anaplásico ocupan el 10% restante (CBTRUS 2010).

Clasificación

Los gliomas malignos son tumores invasivos que derivan de células gliales (astrocitos, oligodendrocitos o células ependimarias) y son histológicamente heterogéneos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a los astrocitomas en cuatro grados:

- Grado I, astrocitomas pilocíticos. Son clásicamente asintomáticos al principio de la enfermedad, tienen una limitada capacidad invasiva y con poca frecuencia

progresan a gliomas anaplásicos. Sin embargo, a pesar de ser grado I, estos tumores pueden tener pleomorfismo celular e hiperplasia microvascular.

- Grado II, astrocitomas difusos. Tienen la capacidad de expandirse desde la lesión cerebral primaria hacia el tejido cerebral adyacente y presentan una alta tasa de progresión hacia tumores anaplásicos. Están bien diferenciados y tienen un pleomorfismo nuclear que va de leve a moderado (Sanai, et al., 2005).

Los grados III y IV son gliomas malignos.

- Grado III, astrocitomas anaplásicos. Se caracterizan por tener una celularidad aumentada, atipia nuclear y una intensa actividad proliferativa.
- Grado IV, GBMs. Presentan las mismas características de los tumores grado III, pero también contienen áreas de proliferación microvascular, necrosis, o ambas (Wen y Kesari, 2008). Como característica patognomónica, los GBMs raramente presentan metástasis, pero a menudo generan tumores satélites en el parénquima cerebral.

Factores de riesgo

Se ha reportado que el GBM es ligeramente más frecuente en los hombres que en las mujeres (CBTRUS 2010). El único factor de riesgo ambiental demostrado como inductor de gliomas es la exposición a la radiación, ya sea terapéutica o por altas dosis ambientales. Se ha demostrado que las dosis altas de radioterapia para el tratamiento de tumores, localizados en otros sitios que no sea el cerebro, se relacionan con GBM (Edick, et al., 2005. Ohgaki y Kleihues, 2005). Por otro lado, la relación entre la radiación

electromagnética y el uso de teléfonos móviles con gliomas no ha sido apoyada por estudios epidemiológicos (Ohgaki, 2009. Kyritsis, et al., 2010. Inskip, et al., 2001).

La mayor incidencia de gliomas (incluyendo astrocitomas y GBMs) se asocia a diversos trastornos genéticos, como lo son la neurofibromatosis y los síndromes de Von Hippel-Lindau, Li Fraumeni y Turcot.

Algunas alteraciones genéticas se han observado y asociado con el desarrollo de GBM, por ejemplo: se han encontrado copias extras del cromosoma 7 y el oncogén EGFR, Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal (EGF), se ha observado amplificado en los pacientes con gliomas (Libermann, et al., 1985). Además, estudios de cariotipo y de pérdida de la heterocigosidad han definido la ubicación del locus supresor tumoral en los cromosomas 9, 10, y 17 (James, et al., 1989). El gen *p53* juega un papel importante controlando el ADN genómico dañado, induce la detención del ciclo celular para permitir la reparación del ADN y puede activar apoptosis para erradicar a las células dañadas (Yin y Van Meir, 2009). Así, las mutaciones del gen *p53*, supresor de tumores, son las alteraciones más frecuentes en el cromosoma 17 en pacientes con GBM.

Otros genes supresores tumorales disminuidos en los gliomas son: *p16* y *pten* (Homólogo de la Fosfatasa y Tensina) en los cromosomas 19 y 10, respectivamente. El gen *p16* detiene la progresión del ciclo celular, mientras que *pten* es un regulador negativo de la Fosfoinositida-3-cinasa (PI3K), que es la ruta más importante para estimular la proliferación celular en presencia de factores de crecimiento (Stokoe y Furnari, 2009).

Por otro lado, el gen de la Isocitrato deshidrogenasa1 (*idh1*), importante en el metabolismo de los carbohidratos debido a que participa en el ciclo de Krebs y cataliza la descarboxilación oxidativa del isocitrato en 2-oxoglutarato, y menos frecuentemente el gen *idh2*, están mutados en un alelo en algunos GBMs (Parsons, et al., 2008). Esta mutación conduce al cambio de un aminoácido (aa) (arginina 132) en el sitio activo de la

IDH1. Se ha propuesto que esto podría tener un efecto oncogénico indirecto a través de la activación de la vía del factor inducible por hipoxia (Zhao, et al., 2009. Segovia y López-Ornelas, 2011).

Presentación clínica

Los tumores cerebrales presentan síntomas neurológicos, tanto generalizados como focales. Los síntomas generalizados están relacionados con el aumento de la presión intracraneal, la cual ocasiona náuseas y vómitos. Los síntomas y signos focales reflejan la ubicación intracraneal del tumor. La duración y frecuencia de los síntomas pueden variar de acuerdo con el tipo de glioma intracraneal, por ejemplo, una hemiparesia de rápido desarrollo es típica en gliomas de alto grado (DeAngelis, 2001).

La cefalea es el síntoma más frecuente asociado con tumores cerebrales, es típicamente difusa y puede indicar el hemisferio donde se encuentra el tumor (Forsyth y Posner, 1993). En segundo lugar, se presentan convulsiones en el 15 al 95% de los pacientes con tumores cerebrales y son más frecuentes en los gliomas de bajo grado. Clásicamente, las crisis son focales pero pueden generalizarse. También, la hemiparesia postictal o afasia (fenómeno de Todd) pueden indicar la ubicación de la lesión (DeAngelis, 2001).

Diagnóstico

Actualmente, la Imagen por Resonancia Magnética Funcional (IRMF) y la Imagen por Resonancia Magnética (IRM) son los métodos más comunes y eficaces utilizados para el diagnóstico de los gliomas. Sin embargo, la Tomografía Computarizada Contrastada (TC de cráneo) todavía puede sugerir la presencia de gliomas malignos mostrando lesiones

con reforzamiento anular. Estos estudios de imagen muestran una masa heterogénea aumentada con un edema circundante (Segovia y López-Ornelas, 2011). Por lo general, los GBMs tienen áreas centrales de necrosis y edema peritumoral, éste último está más asociado con gliomas anaplásicos (Cha, 2006).

Desde el punto de vista histológico, el diagnóstico se basa principalmente en la alta actividad mitótica y en la atipia nuclear. La presencia de áreas con proliferación vascular, atipia celular y necrosis en una lesión de glioma se considera patognomónica de GBM (Brat y Van Meir, 2004).

La base para el diagnóstico de tumores cerebrales es una evaluación clínico-patológica. Sin embargo, los estudios de expresión génica en GBM han establecido los perfiles de transcripción que reflejan la biología del tumor y pueden ser utilizados para la clasificación de tumores y predecir el estado del paciente y la respuesta al tratamiento (Sulman, et al., 2009). Así, una clasificación con base en hallazgos moleculares y genéticos ha sido propuesta (Idbaih, et al., 2008):

- Grupo A, tumores con una codeleción 1p19q, relacionados con buena supervivencia.
- Grupo B, tumores con la amplificación del EGFR, lo cual tiene un pronóstico desfavorable.
- Grupo C, tumores con la ganancia del cromosoma 7, deleción del 9p y/o pérdida del cromosoma 10. Los pacientes son más jóvenes en comparación con el grupo B, es de pronóstico intermedio y el número de alteraciones cromosómicas es inversamente proporcional con el pronóstico.
- Grupo D. Tumores sin clasificación.

Tratamiento

El tratamiento se imparte tomando en cuenta: la localización del tumor, la edad del paciente y el grado de Karnofski (donde una escala de 50 o menos indica un alto riesgo de muerte durante los próximos 6 meses, la mayoría de las veces generada por el grado de discapacidad y complicaciones secundarias). En las regiones cerebrales donde es posible, la cirugía citorreductora es comúnmente seguida de radioterapia, la cual consiste en la aplicación de 60 Gray (Gy), veinte Gy sobre el tumor y cuarenta Gy holocraneales (Zhang, et al., 2012).

Con frecuencia, un régimen de quimioterapia también se puede administrar y consta de Temozolomida, un agente alquilante cuyo mecanismo de acción radica en la inhibición de la replicación del ADN. Posterior a la administración oral, la Temozolomida cruza la barrera hematoencefálica y alcanza altas concentraciones en el SNC. El tratamiento primario con este fármaco se acompaña de radioterapia y cuando va seguido por 6 ciclos mensuales de Temozolomida, proporciona un aumento en la supervivencia de los pacientes con GBM (Segovia y López-Ornelas, 2011). Por otro lado, el efecto de la Temozolomida está vinculado a los niveles intracelulares de MGMT (O-6-Metilguanina-ADN metiltransferasa) que es una proteína que repara el ADN y protege a las células tumorales contra las drogas alquilantes, por lo tanto, altos niveles de esta proteína se han asociado con resistencia a la Temozolomida (Baer, et al., 1993).

Otros blancos para el tratamiento del GBM son proteínas anormalmente activadas durante la tumorigénesis. Diferentes receptores de factores de crecimiento como el EGFR, el Receptor del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGFR) y el Receptor del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGFR), están amplificados y/o mutados y sobreexpresados en los GBMs. Esto da como resultado un aumento en la supervivencia celular, proliferación celular descontrolada, angiogénesis y migración celular

(Minniti, et al., 2009). Actualmente, nuevos fármacos que tienen como blanco a estos receptores se están investigando.

Desafortunadamente, el uso de nuevos fármacos para el tratamiento del GBM no ha tenido un efecto considerable en la supervivencia de los pacientes, la cual actualmente es de 15 meses posteriores al diagnóstico. Por este motivo, la terapia génica se presenta como una posible alternativa en el tratamiento de este mal. Existen varios ensayos clínicos en curso y que realzan la posibilidad de encontrar terapias adyuvantes en contra de este tipo de tumores.

Terapia Génica

La terapia génica es en la actualidad una promesa terapéutica con utilidad en diferentes patologías; desde enfermedades hereditarias y adquiridas, hasta padecimientos de etiología infecciosa. Por ser una posibilidad de tratamiento prometedora gran parte de la investigación científica se enfoca en la manera de aplicarla a múltiples padecimientos.

La terapia génica se puede definir como la transferencia de material génico (transgén) a una célula hospedera con un efecto benéfico para el paciente (Benítez y Segovia, 2003). Dicha transferencia se logra con técnicas que involucran manipulación celular (microinyecciones) o empleando sistemas de vectores, siendo estos últimos utilizados como mecanismo de transporte del transgén de interés hacia la célula blanco (Anson, 2004).

La terapia génica cuenta con técnicas que permiten dirigir secuencias de ADN o de ARN al interior de células blanco, con el objetivo de modular la expresión de determinadas proteínas que se encuentran alteradas, revirtiendo así el trastorno biológico que ello

produce, o por otro lado, la expresión de proteínas con un efecto terapéutico (Cutter, et al., 2006).

En función del tipo de células blanco, existen dos modalidades de terapia génica:

1.- Terapia génica de células germinales: dirigida a modificar la información genética de las células implicadas en la formación de óvulos y espermatozoides y, por lo tanto, transmisible a la descendencia. Este tipo de terapia génica parece ser la indicada para corregir enfermedades congénitas (Biffi y Cesani, 2008).

2.- Terapia génica somática: dirigida a modificar la información genética de células constituyentes del organismo, donde la modificación genética no puede transmitirse a la descendencia.

Por otra parte, y en función de la estrategia aplicada, la terapia génica puede también clasificarse en:

1.- Terapia génica *in vivo*: abarca técnicas en las que el material génico se introduce directamente en las células del organismo, sin que se produzca su extracción o manipulación *in vitro*. La ventaja de estas técnicas es su relativa sencillez. Sin embargo, tienen el inconveniente de que el grado de control, sobre todo en el proceso de transferencia, es menor. La eficiencia global también es menor (dado que no pueden amplificarse las células transducidas) y, finalmente, es difícil conseguir un alto grado de especificidad tisular transduccional y transcripcional (Grimm, et al., 2008).

2.- Terapia génica *ex vivo*: comprende todos aquellos protocolos en los que las células a tratar son extraídas de manera autóloga o heteróloga, aisladas, crecidas en cultivo y sometidas al proceso de transferencia *in vitro*. Una vez seleccionadas las células que han sido realmente transfectadas o infectadas, se expanden en cultivo y se

introducen de nuevo en el paciente. Sus principales ventajas son el permitir la selección del tipo de célula a tratar, mantener un estrecho control sobre todo el proceso, mayor eficacia en la transferencia génica y disminución de la respuesta inmune. Los problemas más importantes de esta modalidad son su mayor complejidad y el costo de los protocolos, así como la incapacidad de transducir aquellos tejidos que no son susceptibles de crecer en cultivo (Grimm, et al., 2008).

Transferencia génica

La introducción en una célula de material genómico se denomina transferencia génica, transducción o infección (cuando se emplean virus) o transfección (cuando se emplea un plásmido). La terapia génica requiere que se transfieran eficientemente los fragmentos de ADN clonados a células hospederas, de manera que los genes introducidos sean expresados en la cantidad adecuada. Posterior a la transferencia génica, los genes insertados se pueden llegar a integrar en los cromosomas de la célula, o bien quedar como elementos génicos extracromosómicos (episomas) (Segovia y López- Ornelas, 2011).

Genes integrados en cromosomas

La importancia de que un transgén se integre al cromosoma radica en la perpetuación por replicación cromosómica después de la división celular. Como las células de la progenie también contienen los transgenes introducidos, se puede obtener una expresión estable a largo plazo. Así, en los tejidos formados por células en división activa, la clave es dirigir la modificación hacia las células troncales (una población minoritaria de células precursoras indiferenciadas que dan lugar a las células diferenciadas maduras del tejido). Además, las células troncales no sólo dan lugar a células maduras del tejido, sino que al mismo tiempo se autorenewan. La transferencia eficiente de transgenes a células

troncales y la posterior expresión estable del transgén ofrece la posibilidad de curar patologías (Zubler, 2006).

La integración cromosómica presenta inconvenientes debido a que la inserción es al azar y la localización de los transgenes insertados puede variar entre las células. En algunos casos, los transgenes insertados pueden no expresarse debido a su inserción en regiones muy condensadas. En otras ocasiones, la integración puede provocar la muerte de la célula hospedera; por ejemplo, por inserción en un gen crucial e inactivación del mismo (Wu y Sato, 2003). La mayor inquietud reside en el riesgo de generar cáncer, ya que, la integración del transgén puede alterar los patrones normales de expresión de genes que controlan la división o proliferación celular; por ejemplo, a través de la activación de un oncogén, la inactivación de un gen supresor tumoral o de un gen implicado en la apoptosis (Grimm, et al., 2008).

Genes no integrados

Algunos sistemas de transferencia génica están diseñados para transferir genes en células donde quedan como elementos episomales y logran una expresión elevada. Si las células están en división activa, el transgén introducido puede no segregarse equitativamente a las células hijas, por lo que la expresión a largo plazo puede disminuir (Ehrhardt, et al., 2008). El resultado es que la posibilidad de curar un trastorno genético puede ser remota; harían falta tratamientos repetidos. No obstante, en algunos casos puede no hacer falta una expresión estable a largo plazo; por ejemplo, la terapia génica contra el cáncer suele implicar la transferencia y expresión de transgenes en células cancerosas con la intención de erradicarlas, una vez eliminado el tumor, el gen terapéutico no es necesario.

Métodos de transferencia génica

Para lograr un efecto biológico empleando terapia génica, es necesario introducir de manera eficaz la secuencia transgénica de interés en la célula blanco y conseguir su expresión. Estos objetivos deben contar con un adecuado sistema de direccionamiento o transferencia y, al mismo tiempo, disponer de promotores adecuados para conseguir la máxima expresión del transgén insertado en la célula (Robbins y Ghivizzani, 1998). Los principales sistemas de transferencia génica se pueden clasificar en dos tipos: vectores no virales y vectores virales.

Sistemas de vectores

Vectores no virales

Los métodos de transferencia génica físico-químicos o no virales (tabla 1) fueron los primeros en ser desarrollados. En estos métodos el ADN exógeno está integrado en un plásmido, el cual es una molécula de ADN que puede ser mantenida de manera episomal.

Tabla 1. Vectores no virales

Microinyección
Precipitación con fosfato de calcio
Electroporación
Bombardeo con micropartículas
Inyección directa del ADN “desnudo”
Conjugados ADN-proteínas
Sistema poliplex
Liposomas

En general estos métodos presentan las siguientes ventajas: son sencillos de preparar permitiendo su producción en forma masiva, no tienen limitaciones en cuanto al tamaño del ADN que pueden transferir, son poco tóxicos y no son inmunogénicos. Los

inconvenientes de estos métodos son su baja eficacia en la transfección de células blanco y que algunos de ellos sólo pueden utilizarse *in vitro* (Boulaiz, et al., 2005).

Los vectores no virales más empleados han sido dos: 1.- Los liposomas catiónicos y 2.- El ADN desnudo (Benítez, et al., 2008). En el primero, la estrategia recae en las propiedades de carga eléctrica del ADN (negativo debido a la cadena de fosfatos en la doble hélice), en los lípidos catiónicos (carga positiva) y en la superficie celular (red de cargas negativas). Los lípidos catiónicos interaccionan con las cargas negativas del ADN, el exceso de cargas positivas de los lípidos permite el transporte del transgén a la célula blanco por endocitosis y, en una menor proporción, por fusión con la membrana celular.

En el segundo, el ADN desnudo está constituido por un plásmido bacteriano que contiene el transgén a transferir y se inyecta directamente en el tejido blanco donde se expresa sin integrarse en el genoma de la célula hospedera.

Un vector que resulta interesante es el sistema poliplex, el cual es un conjugado de: una molécula de poli-L-lisina, un ligando para el cual las células blanco tienen receptores de superficie y ADN plasmídico con el transgén de interés. Nuevos vectores de este tipo también contienen un péptido fusogénico, derivado del extremo amino terminal de la hemaglutinina HA2 del virus de la influenza y un péptido cariofílico, derivado del virus SV40. Cuando el ligando del poliplex es reconocido por los receptores celulares específicos, es endocitado y la expresión del transgén se da vía episomal (Martínez-Fong, et al., 2012).

Vectores virales

Los virus están constituidos por pequeños ácidos nucleicos (ADN o ARN) encapsulados en envolturas proteicas que los protegen y les permiten infectar a las

células. Una vez en el interior de la célula, la información contenida en el ácido nucleico dirige la síntesis de proteínas virales, aprovechando los organelos y el aparato productor de energía de la célula hospedera, y de este modo se generan nuevos viriones (Waehler, et al., 2007).

Los vectores virales (tabla 2) son un sistema de transferencia de genes que se basa en la estructura y propiedades de los virus en su forma silvestre. Para ser empleados en terapia génica, en la mayoría de los casos, se debe eliminar su capacidad de replicación e introducir el transgén deseado sin modificar otras características propias que condicionen su eficiencia al infectar células. Algunos virus empleados en la terapia génica conservan la propiedad de replicarse, ya sea de manera condicionada o como virus oncolíticos, estos últimos tienen una replicación selectiva en células tumorales, lisándolas y liberando viriones que infectan células tumorales adyacentes (Bouard, et al., 2008).

Tabla 2. Vectores virales

Adenovirus
Adenoasociados
Herpesvirus
Retrovirus
Lentivirus

Los vectores virales que se obtienen por eliminación de uno o más genes indispensables para la replicación del virus y su sustitución por el transgén terapéutico son virus defectuosos, lo que significa que mantienen la capacidad de infectar células pero son incapaces de multiplicarse en ellas.

Los vectores virales son los sistemas más eficaces para transferir genes, debido a que infectan una elevada proporción de células blanco, es decir, poseen una elevada eficacia de transducción, que en algunos casos llega a ser del 100% (Waehler, et al., 2007).

La seguridad en el uso de un vector viral constituye una preocupación, bien porque puede producirse una transferencia involuntaria del virus nativo patógeno, o bien porque pueda activarse un virus patógeno o un oncogén debido a la posibilidad de recombinación génica al insertarse un gen exógeno o una secuencia promotora en el genoma del huésped.

Otro punto clave a considerar es que, en la terapia génica *in vivo* el organismo receptor desencadena una respuesta inmune y ésta puede eliminar el material genético a través de la muerte de las células genéticamente modificadas. Para contrarrestar esta reacción se intenta eliminar el mayor número posible de genes víricos del vector, con el fin de obtener una expresión más estable del transgén terapéutico.

El ADN del virus en un vector diseñado para terapia génica es alterado con la finalidad de:

1.- Evitar el crecimiento del virus en las células infectadas, con excepción de los virus oncolíticos, pero manteniendo su capacidad para desarrollarse en forma de vector en células auxiliares (empaquetadoras).

2.- Dar espacio en el genoma vírico para la inserción de secuencias de ADN exógeno e incorporar nuevas secuencias que codifiquen y permitan la expresión apropiada del transgén.

De esta forma, podemos considerar que el ADN del vector comprende dos elementos: las secuencias víricas esenciales y la unidad de transcripción del transgén. Debido a que cualquier secuencia del virus puede ser expresada en otra célula, las secuencias víricas no esenciales son eliminadas. Así, un vector contendrá sólo aquellas secuencias esenciales del ADN del virus en *cis*. Las funciones virales necesarias para permitir la replicación del genoma del vector y la producción de proteínas necesarias para

el ensamblaje del virus son aportadas en *trans* con ayuda de células productoras (Bouard, et al., 2008).

Los vectores virales han sido los más usados en ensayos clínicos (Benítez y Segovia 2003, Benítez, et al., 2008). Los más empleados han sido los vectores adenovirales, adenoasociados, retrovirales y un género de estos últimos, los vectores lentivirales. Este último tipo, al cual pertenece el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), tiene la ventaja de transducir células tanto en proliferación como a células no-mitóticas y a nivel del SNC es de los menos inmunogénicos (Le Doux, 2008).

Vectores Adenovirales

Los adenovirus son vectores que no tienen envoltura y presentan una doble cadena de ADN y en donde los vectores de primera generación tenían la capacidad de albergar transgenes de hasta 10 kilobases (kb). Estos virus no se integran al ADN genómico y tienen una transcripción episomal, la cual se va perdiendo conforme la célula prolifera. Infectan células en mitosis y no proliferativas y son considerados una buena opción debido a que se obtienen en títulos virales altos, pueden ser inyectados directamente en el tumor y tienen una alta eficiencia de transducción (95-100%) (Benítez y Segovia 2003, Benítez, et al., 2008). Tienen como desventajas infectar células tumorales y no tumorales, una corta expresión del transgén y ser altamente inmunogénicos (Le Doux, 2008). Los adenovirus denominados *gutless*, *helper dependent* o *fully deleted*, constituyen la última generación de vectores adenovirales y parecen disminuir de manera significativa estas desventajas (Morsy, et al., 1998. Morsy y Caskey, 1999).

Las terapias que utilizan este vector han sido en su mayoría las que llevan el transgén suicida de la Timidina Kinasa del Virus Herpes Simplex (HSV-TK), los cuales son inyectados en el tumor y posterior a la administración de Ganciclovir (análogo del

nucleósido 2-deoxiguanosina) se observa un efecto inhibitor en la síntesis del ADN. Este efecto se observa en las células infectadas y en las células adyacentes debido al probable paso de moléculas tóxicas a través de las uniones estrechas, dicho efecto también se observa en infecciones con vectores retrovirales (Natsume y Yoshida, 2008).

Los adenovirus cuentan con cuatro unidades transcripcionales, cada una con un promotor y la última unidad transcrita codifica proteínas requeridas para la formación del virus. La transcripción es secuencial, en donde los genes *E1* se expresan de manera temprana y activan la transcripción de otros genes. La función de la proteína E1 es la de inducir el ciclo celular, dejando a las células infectadas competentes para sintetizar el ADN y proteínas virales. El gen *E3* codifica funciones para detener los mecanismos de defensa inmunológicos de la célula infectada. El gen *E2* codifica proteínas implicadas en la replicación del ADN. La región *E4* codifica funciones que regulan la transcripción del virus (Le Doux, 2008).

Dos tipos generales de vectores basados en adenovirus han sido empleados, donde se suprimen las regiones *E3* y *E1* respectivamente. La eliminación de la región *E3* permite la inserción de secuencias de ADN exógeno para producir vectores capaces de una infección eficaz y lograr la síntesis transitoria de proteínas. La supresión de la región *E1* incapacita al adenovirus y da más espacio para albergar transgenes, así el adenovirus sólo es capaz de producirse por medio de células cooperadoras (Bachtarzi, et al., 2008).

En el caso de los adenovirus *gutless*, el genoma carece de todos los genes virales y sólo conservan las secuencias que actúan en *cis*, es decir, los ITRs (*Inverted Terminal Repetitions*) y la secuencia de encapsidación. Estos virus pueden transportar material génico exógeno de hasta 37 kb (Morsy, et al., 1998. Morsy y Caskey, 1999).

Vectores Adenoasociados

Los vectores adenoasociados (AAV) derivan de pequeños virus de ADN de cadena sencilla no envueltos de la familia *Parvoviridae* y que requieren la colaboración de otros virus del tipo adenovirus y herpes virus para replicarse eficientemente. Estos virus se integran en un sitio determinado del ADN de la célula hospedera (cromosoma 19 en humanos) sin producir patología, siendo esto una ventaja al momento de compararlos con los retrovirus. Presentan como ventajas una expresión estable del transgén, baja inmunogenicidad y pueden transducir células en proliferación y no mitóticas. Estos virus pueden integrarse al ADN de la célula hospedera o tener una transcripción episomal y su mayor limitante es el tamaño del genoma (4.7kb) (Pulkkanen e Yla-Herttuala, 2005).

El genoma de los virus adenoasociados está conformado por dos genes: 1) *cap*, que codifica una familia de tres proteínas estructurales virales y 2) *rep*, que codifica proteínas involucradas en la replicación e integración. Los extremos del genoma contienen repeticiones terminales (RT) de aproximadamente 145 nucleótidos.

Los vectores con base en AAV contienen sólo las secuencias víricas RT que circunvalan la unidad de transcripción del transgén. El desarrollo de vectores AAV lleva consigo la introducción en la célula hospedera del vector y también de un plásmido que codifica *rep* y *cap* para suministrar las funciones del virus (Logan y Alexander, 2012).

Vectores Retrovirales

Los retrovirus estructuralmente cuentan con una envoltura viral y un ARN genómico que es retrotranscrito a ADN por medio de la transcriptasa reversa. Son empleados en la terapia génica por infectar células en proliferación, tener una baja respuesta inmune y lograr una expresión a largo plazo (Miller, 2001). Presentan como

desventajas una capacidad transgénica limitada (8kb), integración de manera aleatoria en el ADN de la célula infectada (incrementado el riesgo de mutagénesis) y se obtienen en títulos virales bajos.

Fueron los primeros vectores utilizados en terapia génica de múltiples enfermedades como son: el Síndrome de Inmunodeficiencia Combinada Severa (SICS), Fibrosis quística y en el tratamiento de distintos tipos de cáncer, entre ellos tumores del SNC. La mayoría de los estudios que emplean este vector están basados en el Virus de la Leucemia Murina de Moloney (MoMLV) (Curiel, 2002).

El genoma de los retrovirus es pequeño (10 kb) y está conformado por tres genes: 1) *gag*, el cual codifica un grupo específico de antígenos y proteínas de la cápside; 2) *pol*, que tiene la información para la transcriptasa reversa, la proteasa y la integrasa; y 3) *env*, que codifica para proteínas de la envoltura viral. A los extremos del genoma se les denomina LTRs (*Long Terminal Repeats*) e incluyen secuencias involucradas en la integración del virus al ADN de la célula infectada. El genoma viral también contiene una secuencia necesaria para el empaquetamiento del ARN viral y otras secuencias para el corte y empalme entre el ADN viral y el ADN hospedero (Vile, et al., 1996).

Vectores Lentivirales

Los lentivirus pertenecen a la familia *Retroviridae*, su genoma es más complejo que el MoMLV y cuentan con dos genes adicionales; *tat* y *rev*, los cuales proveen al virus con la capacidad de transducir células postmitóticas, debido a que codifican proteínas con características cariofílicas (las proteínas de matriz, la integrasa y la proteína viral R) que permiten el transporte activo del complejo nucleoprotéico formado por el ADN bicatenario y proteínas necesarias para la integración al núcleo de la célula hospedera (Dishart, et al., 2003).

El lentivirus mas empleado en la terapia génica está basado en el VIH-1 (Benítez, et al., 2008). Estos vectores cuentan con la capacidad de albergar transgenes moderadamente grandes (10kb), logran una expresión estable, infectan células mitóticas y no proliferativas y en comparación con los retrovirus tienen un mayor grado de infección.

Terapia génica en enfermedades monogénicas

La terapia génica fue inicialmente concebida como tratamiento para enfermedades genéticas causadas por mutación de un sólo gen, de las cuales se conocen aproximadamente 4,000 (Baranov, 2000). Las enfermedades hereditarias comprenden trastornos de diversa índole, en los que un gen defectuoso determina que no se sintetice una proteína específica, o bien que se elabore una proteína anormal. En ambos casos, la ausencia de la proteína normal o el aumento de la función de la proteína mutada (enfermedad de Huntington) pueden ocasionar diversas manifestaciones clínicas, según la función estructural o enzimática que normalmente ejerce dicha proteína en las células. Así, los cuadros varían desde leves, que no necesitan tratamiento o no existe en la actualidad (como el daltonismo), hasta enfermedades graves (como la fibrosis quística y la hemofilia). En términos generales, se trata de enfermedades en las que la farmacoterapia convencional resulta poco eficaz. Sólo para algunos de estos trastornos se han desarrollado y aplicado tratamientos basados en la sustitución de la proteína defectuosa (como sería el factor VIII en el caso de la hemofilia A, o la enzima adenosina desaminasa en el SICS). Dichos tratamientos sólo tienen una efectividad parcial para disminuir las manifestaciones de la enfermedad y pueden llevar a graves complicaciones (Porteus et al., 2006).

Terapia génica en cáncer

Actualmente, se sabe que las alteraciones genéticas desempeñan un papel transcendental en la patogenia del cáncer. Por una parte, los oncogenes son genes que pueden producir la transformación maligna cuando se expresan de forma inadecuada debido a una mutación y/o amplificación. Los protooncogenes son genes normales que desempeñan un importante papel en la proliferación y diferenciación celular normal, pero que son susceptibles a ser mutados y convertirse en oncogenes, provocando la aparición de tumores. En la mayor parte de los casos, codifican factores de crecimiento, receptores, moléculas implicadas en las vías de transducción de señales y factores de transcripción que regulan la expresión génica (Meng et al., 1998). Por otra parte, los genes supresores tumorales actúan inhibiendo el crecimiento celular y están implicados en la génesis del cáncer cuando se pierden o inactivan.

Estrategias en terapia génica del cáncer

Respecto al cáncer, el enfoque no va dirigido a tratar de corregir un defecto genético, como ocurre en las enfermedades monogénicas, sino el de utilizar la manipulación génica para dotar de nuevas propiedades a las células, que permitan aprovecharlas en algún aspecto de la patología oncológica con fines terapéuticos.

En la actualidad, se han desarrollado distintas estrategias en la terapia génica contra neoplasias y se están realizando diversos ensayos clínicos para tratar diferentes tipos de cáncer como son: mama, ovario, cabeza y cuello, pulmón, próstata, células renales, tumores cerebrales, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, linfomas, melanoma y mieloma múltiple (Karamouzis et al., 2007).

Las diferentes estrategias aplicadas en los ensayos clínicos realizados en terapia génica del cáncer son:

- Aumentar la actividad antitumoral de células inmunes por medio de citocinas (interleucinas, factores de necrosis tumoral, factores estimulantes de colonias o interferones) (Butowski, 2010).
- Aumentar la inmunogenicidad del tumor introduciendo antígenos exógenos (vacunas tumorales) (Van Gool et al., 2009).
- Introducir un gen "suicida" o de sensibilidad aumentada a determinados fármacos. Se transduce el gen de una enzima (Timidina cinasa) que es activada selectivamente por un profármaco (Ganciclovir) (Natsume, Yoshida J, 2008).
- Bloquear la expresión de oncogenes mediante terapia antisentido (Trojan, et al., 2007).
- Introducir genes supresores tumorales (*p53*) (Hamel y Westphal, 2003).
- Eliminación de células tumorales mediante adenovirus oncolíticos (Pulkkanen y Yla-Herttuala, 2005).
- Transferencia de genes con efecto antiangiogénico, para inhibir la formación de vasos sanguíneos inducidos por el propio tumor (Van Meir, et al., 2010).
- Introducir genes de resistencia a fármacos para reducir la toxicidad de la quimioterapia, particularmente sobre la médula ósea (Lu y Shervington, 2008).

Hoy en día, hasta el 67% de los estudios clínicos relacionados con terapia génica son para el tratamiento del cáncer y los tumores primarios del SNC, principalmente los GBMs, surgen como fuertes candidatos para la terapia génica, debido a que están localizados en un sitio anatómico aislado (limitado por el cráneo y envuelto por las meninges) y por presentar metástasis en raras ocasiones (Benítez et al, 2003, 2008).

Como se mencionó anteriormente, el uso de la terapia génica en el campo del cáncer puede ser transfiriendo: genes involucrados en las vías de señalización de muerte celular; genes que codifican una molécula tóxica para el tumor y; genes supresores tumorales. Esta transferencia génica tiene como objetivo la expresión del transgén terapéutico únicamente en células tumorales, sin afectar células sanas, y tener un efecto antitumoral. Dicho efecto se logra cuando disminuye la tasa de proliferación del tumor y/o por la erradicación de células cancerosas.

Terapia génica en glioblastoma

Los adenovirus y retrovirus han sido los métodos de transferencia génica más empleados en este campo y principalmente han sido tres los enfoques utilizados en los ensayos clínicos para los gliomas: 1) la terapia génica suicida; 2) la terapia génica con citocinas y; 3) la terapia viral oncolítica. La estrategia más empleada ha sido la terapia génica suicida (tabla 3) y el transgén utilizado más frecuentemente en estos ensayos ha sido el gen de la HSV-TK.

Para el enfoque de la terapia génica con citocinas (tabla 4) se han empleado los siguientes transgenes: IL-2, IFN- β , IL-4 y GM-CSF (Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos). Sin embargo, el edema cerebral causado por la respuesta inflamatoria genera daño en el SNC, independientemente del vector empleado.

Tabla 3. Ensayos clínicos empleando terapia génica suicida

Fase	Vector	Transgén	SM	Referencia
ND	Adenovirus	HSV-TK	14.4	Immonen, et al., 2004.
I	Adenovirus	HSV-TK	6.2	Chiocca, et al., 2004.
I	Retrovirus	HSV-TK	8	Harsh, et al., 2000.
I	Retrovirus	HSV-TK	8.1	Ram, et al., 1997.
I	Retrovirus	HSV-TK	7.4	Sandmair, et al., 2000
I	Adenovirus	HSV-TK	14	Sandmair, et al., 2000.
I	Adenovirus	HSV-TK	4	Trask, et al., 2000.
I	Adenovirus	HSV-TK	10.4	Germano, et al., 2003.
I	Retrovirus	HSV-TK	8.6	Shand, et al., 1999.
I	Adenovirus	HSV-TK	4	Smitt, et al., 2003.
I/II	Retrovirus	HSV-TK	8.4	Prados, et al., 2003.
I/II	Retrovirus	HSV-TK	5	Izquierdo, et al., 1996.
III	Retrovirus	HSV-TK	12	Rainov, et al., 2000.

ND, No Disponible; HSV-TK, Timidina Cinasa del Virus Herpes Simplex; SM, Supervivencia Media.

Tabla 4. Ensayos clínicos empleando terapia génica con citocinas

Fase	Vector	Transgén	SM	Referencia
I	Liposomas	IFN- β	ND	Wakabayashi, et al., 2008
I	Retrovirus	IL-4	10	Okada, et al., 2004
Piloto	Retrovirus	*B7-2, GM-CSF	ND	Parney, et al., 2006
I	Retrovirus	IL-2, HSV-TK	ND	Barzon, et al., 2009

ND, No Disponible; IFN, Interferón; IL, Interleucina; GM-CSF, Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos; * Molécula co-estimuladora de células T; SM, Supervivencia Media.

La terapia oncolítica viral (tabla 5) usa virus de replicación competente para infectar y lisar a las células tumorales. El problema principal con esta terapia es el efecto limitado en el sitio de administración.

Tabla 5. Ensayos clínicos empleando virus oncolíticos

Fase	Vector	Transgén	SM	Referencia
I	HSV	Sin transgén	9	Rampling, et al., 2000.
I	HSV	Sin transgén	6	Markert, et al., 2000.
I	HSV	Sin transgén	6.5	Papanastassiou, et al., 2002
I	HSV	Sin transgén	11.3	Harrow, et al., 2004.

HSV, Virus Herpes Simplex; SM, Supervivencia Media.

Se ha observado que los retrovirus de replicación deficientes, utilizados en ensayos clínicos transduciendo genes suicidas, infectan sólo a células en división. Sin embargo, su baja eficacia en la transducción, así como el potencial de mutaciones por inserción, han impedido su uso (Vile y Russell, 1995. Rainov y Ren, 2003).

Por otro lado, los vectores adenovirales logran transducir tanto a células en proliferación como a células en reposo y ofrecen una alta expresión del transgén, además parecen ser seguros para el uso humano. La respuesta inmune, característica de este virus, puede proporcionar efectos antitumorales en el tratamiento del cáncer (Sandmair, et al., 2000. Danthinne e Imperiale, 2000. Romano, et al., 2000. Kay, et al., 2001.). Al mismo tiempo, los adenovirus pueden ser diseñados de diferentes maneras para conseguir una replicación condicional o una expresión celular específica (Alemany, et al., 2000. Kanerva y Hemminki, 2004).

A pesar de que los adenovirus y retrovirus han sido los vectores más comúnmente empleados para la terapia génica de GBM, los dos virus han tenido limitantes. Entre estas se encuentran la baja eficacia en la transducción cuando se utilizan retrovirus y un efecto limitado al sitio de aplicación en el caso de los adenovirus.

Por otro lado, existen dos problemas principales relacionados con la eficacia de las estrategias en la terapia génica para el tratamiento de los gliomas. La primera es que los vectores virales infectan un número relativamente pequeño de células, esto debido a una difusión deficiente de los vectores virales dentro del parénquima cerebral y que causa que sólo las células cercanas al sitio de administración sean infectadas. También, esto se relaciona con la posibilidad de que las células sanas se pueden infectar y expresen un gen potencialmente dañino. El segundo problema está dado por los vectores que integran su transgén en el genoma de la célula infectada y pueden provocar mutaciones insercionales, tal y como ha ocurrido con los vectores retrovirales (Anson, 2004, Kim, et al., 2008. Hacin-Bey-Abina, et al., 2003,2008. Howe, et al., 2008).

Una estrategia interesante para el tratamiento de los gliomas es el uso de CTNs, las cuales son una población minoritaria de células con la capacidad de diferenciarse en cualquier linaje del SNC, tales como neuronas y células gliales. Estas células se encuentran en dos regiones del cerebro humano adulto: en el giro dentado del hipocampo y en la zona subventricular (Landgren, et al., 2010. Hirabayashi, et al., 2010).

Estudios recientes han descubierto que las CTNs tienen la capacidad de migrar hacia tumores cerebrales y este tropismo proporciona una nueva herramienta para el tratamiento del GBM, ya que permite la administración de agentes antitumorales para tratar el tumor primario, así, como para el tratamiento de los tumores satélites, siendo estos últimos característicos de la enfermedad (Uhl, et al., 2005. Muller, et al., 2006).

Varias terapias basadas en el uso de CTNs han sido propuestas, incluyendo la liberación de moléculas en sitios específicos del SNC, aumentando así la eficiencia de su liberación, usando estas células como vehículo de genes que expresen una proteína con efecto terapéutico (figura 1). Si la proteína portadora es secretable, puede ejercer su acción sobre las células cancerosas de una manera autocrina y paracrina (Kim, et al., Hingtgen, et al., 2004. Menon, et al., 2009).

Significativamente, el vector usado para la terapia génica de los tumores del SNC debe lograr la expresión específica en las células blanco, evitando así efectos adversos. Por esta razón, se deben encontrar vectores que sean más específicos.

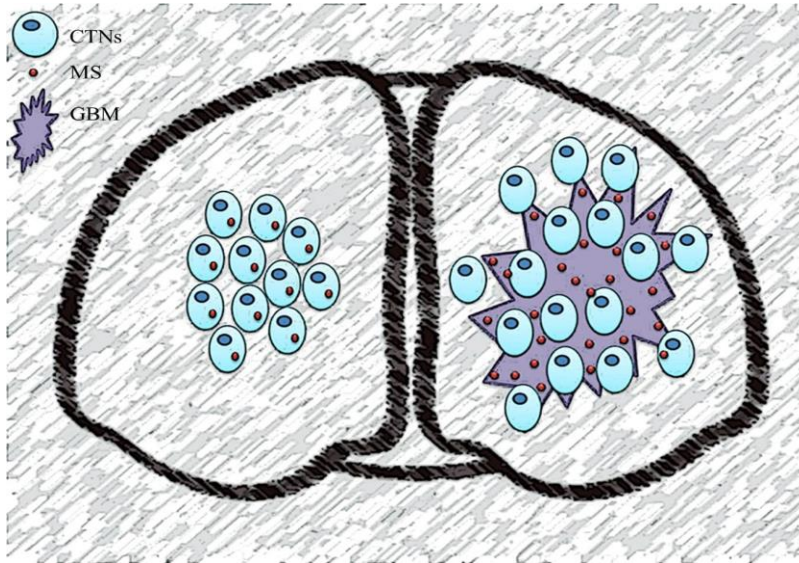


Figura 1. Representación esquemática de la utilización de CTNs como vehículo de transgenes con efecto antitumoral. Las CTNs que expresan un transgén terapéutico, el cual codifica para una molécula secretable y soluble (MS), pueden ser implantadas en el cerebro (o administradas sistémicamente) y migrar hacia un GBM, donde liberarán la molécula activa. CTNs, Células Troncales Neurales; MS, transgén que codifica para una Molécula Soluble; GBM, glioblastoma.

Gas1 como proteína terapéutica

Una proteína con potencial para el tratamiento de los GBMs es Gas1 (Growth Arrest Specific1), la cual es capaz de detener el ciclo celular e inducir apoptosis en células de glioma.

Gas1 pertenece a un grupo de 6 genes que fueron aislados originalmente por hibridación sustractiva de una biblioteca de ADN complementario de fibroblastos de ratón privados de suero (Schneider, et al., 1988). En los seres humanos, *Gas1* está localizado en el cromosoma 9 y tiene un sólo exón, por lo que se cree proviene de un retrotransposón (Hatinen, et al., 2007). Tiene un marco de lectura abierto (ORF) de 1035 pares de bases (pb).

El producto del gen *Gas1* es una proteína de 345 aminoácidos con un dominio N-terminal hidrofóbico, el cual funciona como péptido señal que guía a GAS1 al retículo endoplasmático. Ahí, el péptido señal es escindido, el resto de la proteína es glicosilada, y un ancla de GPI es adherida al extremo C-terminal. Todo esto mediante modificaciones postraduccionales en el dominio C-terminal hidrofóbico (Figura 2). Finalmente, *Gas1* se localiza extracelularmente y la molécula de GPI une a *Gas1* a las balsas lipídicas en la capa externa de la membrana celular (Ruaro, et al., 2000. Stebel, et al., 2000).

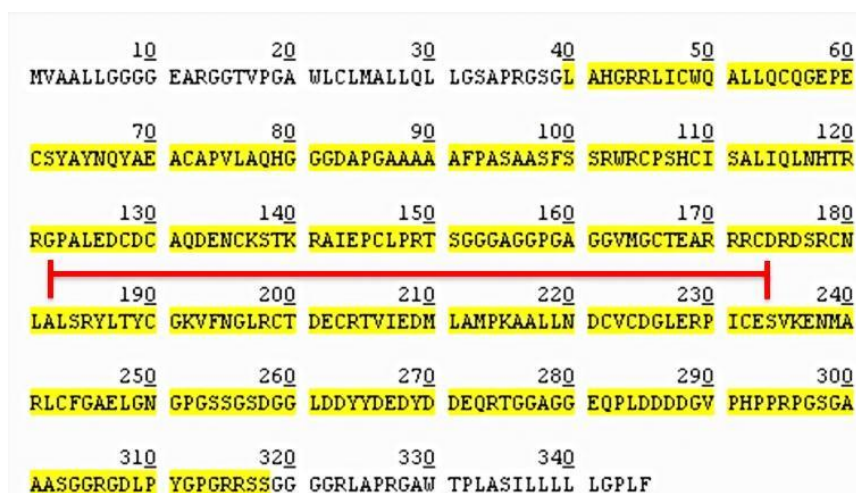


Figura 2. Secuencia de aminoácidos de *Gas1*. La proteína está compuesta por 345 aa, donde el péptido señal va del aa número 1 al 39. La secuencia consenso de reconocimiento para la adhesión del ancla GPI va del aa 318 al 345. La región sombreada en amarillo comprende la forma madura de la proteína (aa 40 al 317) y la línea roja abarca el sitio activo (aa 182 al 234).

Gas1 es expresada durante el desarrollo del SNC y está asociada con muerte celular en el sistema límbico (Lee y Fan, 2001). Sin embargo, *Gas1* induce proliferación celular en el cerebelo (Liu, et al., 2001). Por lo tanto, la función molecular de *Gas1* *in vivo* sigue sin conocerse. Los efectos contradictorios de *Gas1* en diferentes escenarios celulares sugieren que *Gas1* es una proteína pleiotrópica, cuyas funciones dependen del contexto celular en el que se encuentre.

Las vías de señalización intracelular de Gas1 no han sido completamente elucidadas, sin embargo, se ha mostrado que existe una homología significativa entre Gas1 y la familia de receptores GFR α (correceptor para el Factor Neurotrófico Derivado de línea celular Glial, GDNF) (Schueler-Furman, et al., 2006) (Figura 3). Así, Gas1 inhibe la señalización de supervivencia evocada por GDNF.

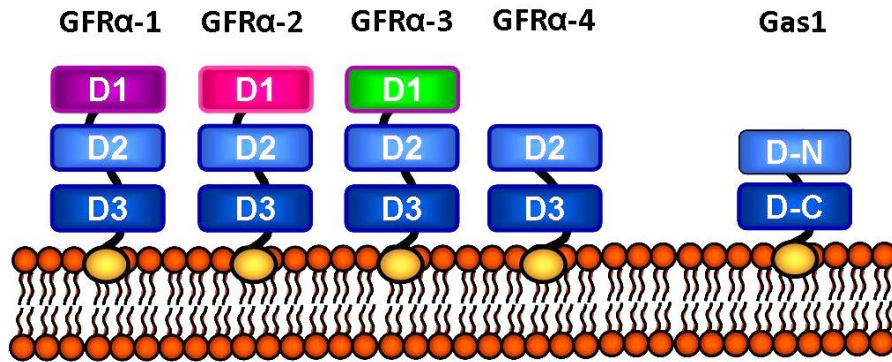


Figura 3. GFR α 1-4 y Gas1. Los receptores GFR α 1-4 y Gas1 se anclan a la capa externa de la membrana celular mediante una molécula GPI. En azul marino se muestran los dominios D3 que son homólogos con el dominio D-C de Gas1. En azul claro se observan los dominios D2, los cuales son homólogos con el dominio D-N de Gas1. (Modificado de la tesis doctoral de Domínguez-Monzón, 2009).

Gas1 altera el patrón de autofosforilación de Ret (receptor tirosina cinasa), inhibiendo la actividad de AKT. La inhibición en la cascada de señalización intracelular de GDNF conduce a la detención del ciclo celular e induce apoptosis mediada por la activación de la caspasa-9 y caspasa-3 (López-Ramírez, et al., 2008. Zarco, et al., 2012) (Figura 4).

Por otro lado, existen datos que indican que Gas1 interactúa con Shh (Sonic hedgehog), una proteína relacionada con proliferación celular durante la embriogénesis. Los estudios iniciales habían propuesto a Gas1 como un antagonista de Shh (Lee, et., 2001), pero estudios más recientes han demostrado que Shh y Gas1 tienen un efecto sinérgico durante el desarrollo y que cuando esta interacción se ve alterada se asocia con

malformaciones craneofaciales, tanto en roedores como en humanos (Allen, et al., 2007. Martinelli y Fan, 1 y 2, 2007. Ribeiro, et al., 2010. Pineda-Álvarez, et al., 2012).

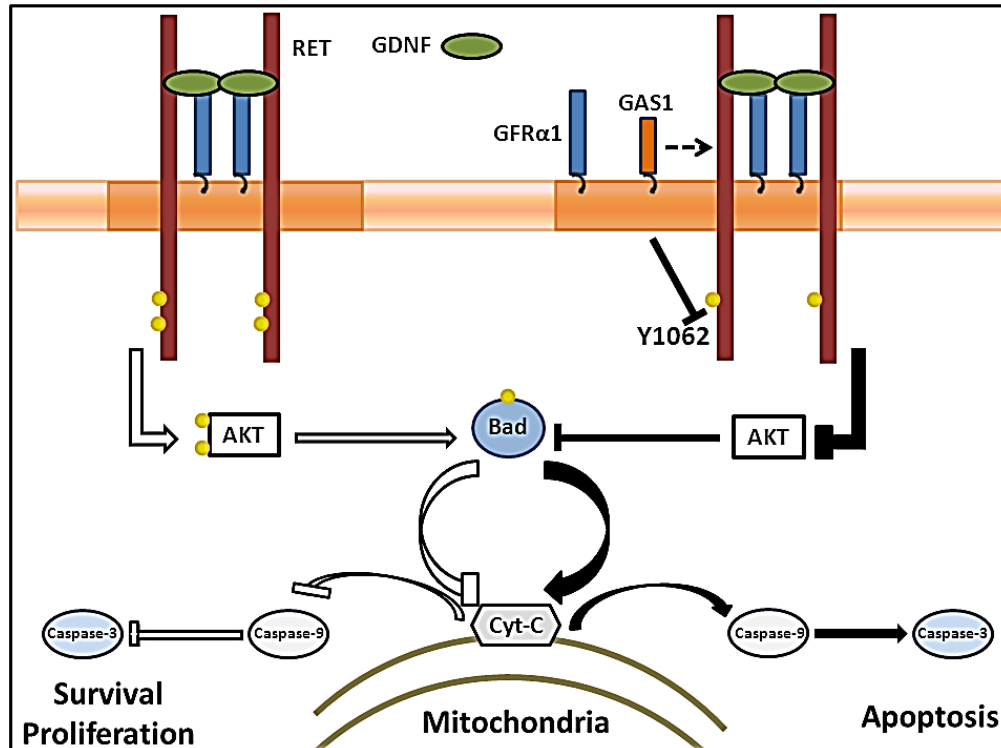


Figura 4. Gas1 interviene en la vía de señalización de Ret. En la mitad izquierda de la imagen se observa la vía de señalización de Ret cuando es dimerizada por la unión de GDNF a su GFRα, esta vía da como resultado supervivencia celular y proliferación. En la mitad derecha de la imagen, se observa que la presencia de Gas1 da como resultado la inhibición en la autofosforilación de Ret, en su tirosina 1062, cuyo resultado final es la apoptosis mediada por vía mitocondrial (caspasa-9) (Tomado de Zarco, et al., 2012).

Gas1, junto con las proteínas Boc y Cdo, actúa como un correceptor putativo que se une a Shh y facilita su vía de señalización (Allen, et al., 2011) (figura 5). Sin embargo, Gas1 induce la detención del ciclo celular y apoptosis en cultivos primarios de gliomas humanos, aun en la ausencia de Shh (Domínguez-Monzón, et al., 2009). También, en ratones knockout para Gas1, se ha visto que a nivel del tracto gastrointestinal, durante el desarrollo, la ausencia de Gas1 desencadena un aumento en la vía de señalización de Ret y una disminución en la vía de Shh (Biau, et al., 2013).

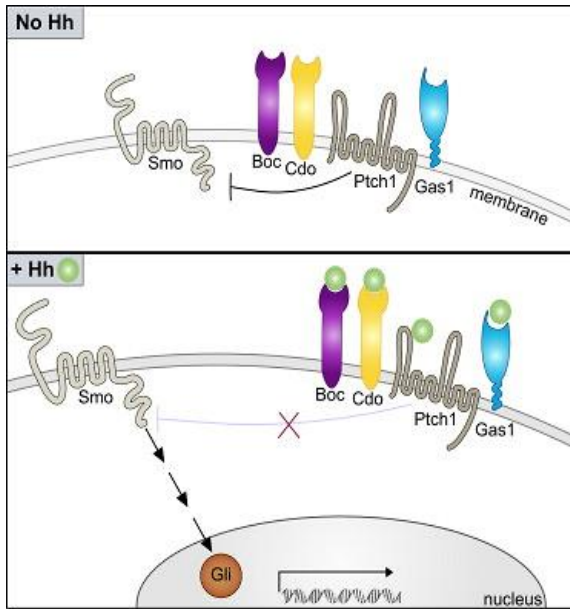


Figura 5. Gas1 y Shh. En la mitad superior de la imagen se observa la presencia de Gas1 sin el ligando Hh, así la proteína *Smoothened* (Smo) es inhibida. Con la presencia del ligando Hh la inhibición hacia Smo se suprime, dando como resultado la activación del factor de transcripción Gli, lo cual resulta en proliferación y diferenciación celular (Allen, et al., 2011).

Diversos estudios han demostrado que la sobreexpresión de Gas1 en diferentes tumores induce la detención del ciclo celular y apoptosis (Evdokiou, et al., 1998. Gobeil, et al., 2008). La sobreexpresión de Gas1 en líneas celulares de glioma y en cultivos primarios de gliomas humanos, ya sea utilizando vectores retrovirales o adenovirales, tanto *in vitro* como en modelos *in vivo*, induce la detención del ciclo celular y apoptosis (Zamorano, et al., 2003, 2004. Benítez, et al., 2007. Domínguez-Monzón, et al., 2009).

Interesantemente, uno de estos estudios analizó el efecto de la coexpresión de Gas1 y p53, y demostró que Gas1 ejerce sus efectos antitumorales independientemente de la presencia de p53 (Benítez, et al., 2007). Este último dato es importante debido a que en la mayoría de los tumores, hasta 75% en el caso de los glioblastomas (Facoetti, et al., 2008), los genes implicados en la vía de señalización de p53 están mutados o inactivados. Por lo tanto, la actividad antitumoral de Gas1, aun en la ausencia de p53, indica que esta proteína podría tener un efecto significativo en la mayoría de los gliomas.

En estos estudios, los vectores empleados tenían a el promotor *gfa2*, un promotor específico de células gliales, para conducir la expresión de *Gas1*, consiguiendo así una

expresión específica en células de origen glial, esto en comparación con otros estudios que utilizan fuertes promotores virales heterólogos, tales como el promotor del Citomegalovirus (CMV) (Shirsat, et al., 2003. Biglari, et al., 2004).

Se ha demostrado que el efecto antitumoral de Gas1 reside en su extremo amino terminal, en particular en el dominio comprendido entre los aa 182 al 234. Además, el medio de cultivo recolectado de fibroblastos de ratón tratados con Fosfolipasa C (PLC), una enzima que rompe el enlace fosfo-glicerol del ancla GPI de GAS1, aplicado sobre fibroblastos en proliferación, induce una disminución de la misma en cultivos celulares independientes. Por otro lado, la expresión de Gas1 sin su ancla GPI mantuvo su actividad inhibidora sobre la proliferación celular (Ruaro, et al., 2000. Stebel, et al., 2000). Estos estudios indican que la actividad de Gas1 reside en su extremo amino terminal y que el ancla GPI no es necesaria para su función.

Basándose en esta información, como proyecto de maestría se llevó a cabo la construcción de cuatro plásmidos de expresión en células eucariotas; dos con la información para *Gas1* secretable (tGas1, con la secuencia de reconocimiento para la adhesión del ancla GPI truncada) y dos con la información completa para *Gas1* (con la secuencia de reconocimiento para la adhesión del ancla GPI), de cada uno de las formas de la proteína, una estaba fusionada al epítipo V5 (Figura 6).

Cada uno de los plásmidos fue transfectado en células C6 (GBM de rata) y se cuantificó la viabilidad celular, observándose una disminución de la misma, pero el efecto fue mayor en las células que expresaron la forma completa (figuras 7-9).

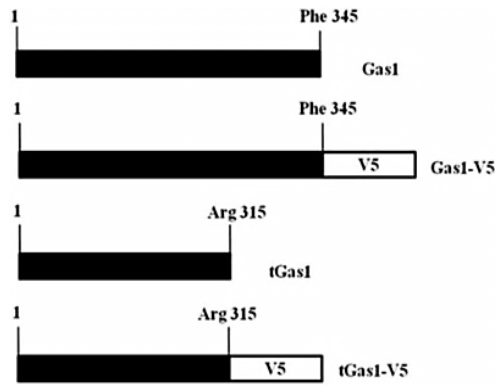


Figura 6. Representación esquemática de las diferentes formas de Gas1. Gas1, corresponde a la proteína completa, con el ancla GPI, e incluye hasta la Fenilalanina (Phe) 345. tGas1, corresponde a la proteína truncada o forma soluble, sin el ancla GPI, e incluye hasta la Arginina (Arg) 315. Las proteínas de fusión para cada una de las formas contienen el epítipo V5 (Gas1-V5 y tGas1-V5) (López-Ornelas, et al., 2011).

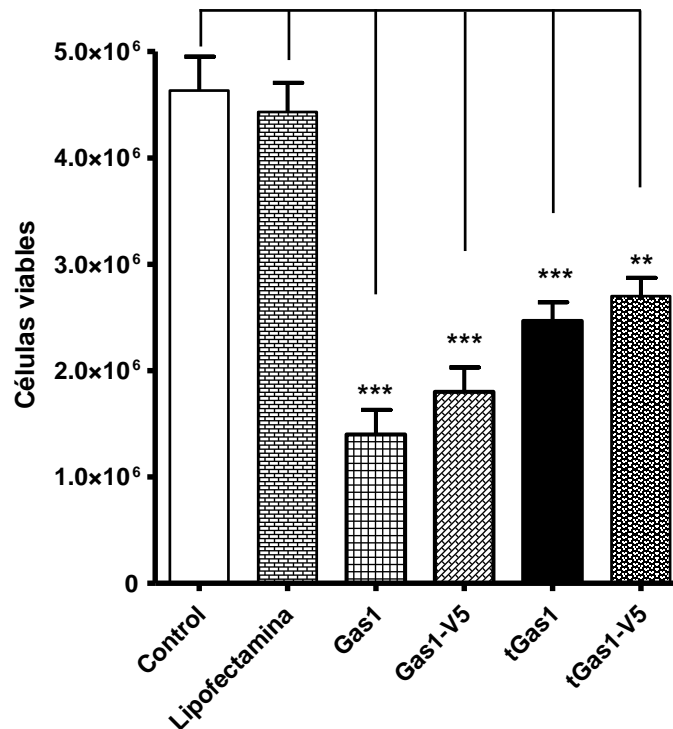


Figura 7. El efecto supresor en la proliferación en las células C6 transfectadas es mayor con Gas1. Número de células C6 viables a las 48 horas postransfección, donde se observa que el menor número de células fue en las células que expresaron Gas1 con el GPI y Gas1 con el GPI más el epítipo V5. Control, células C6 sin transfectar; Lipofectamina, células C6 tratadas sólo con Lipofectamina 2000; Gas1 y Gas1-V5, células transfectadas con cada uno de los plásmidos con la secuencia completa de Gas1, sin y con epítipo V5, respectivamente y; tGas1 y tGas1-V5, células transfectadas con cada uno de los plásmidos con la secuencia truncada de Gas1, sin y con epítipo V5, respectivamente. Los datos representan la media ± del error estándar. ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$, con respecto al control, $n = 5$. (Modificado de López-Ornelas, et al., 2011).

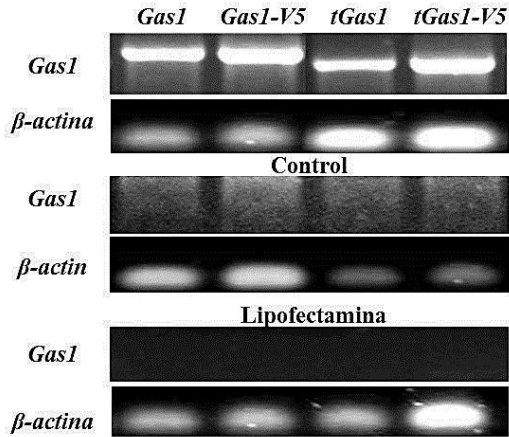


Figura 8. Expresión de Gas1 y tGas1 en las células C6 infectadas. RT-PCR de las células transfectadas donde se amplificó el transgén clonado y transfectado para cada una de las construcciones plasmídicas. Las células control, sin transfectar, y sometidas con Lipofectamina no expresaron *Gas1* o *tGas1*. β -actina, gen de mantenimiento. (Modificado de López-Ornelas, et al., 2011).

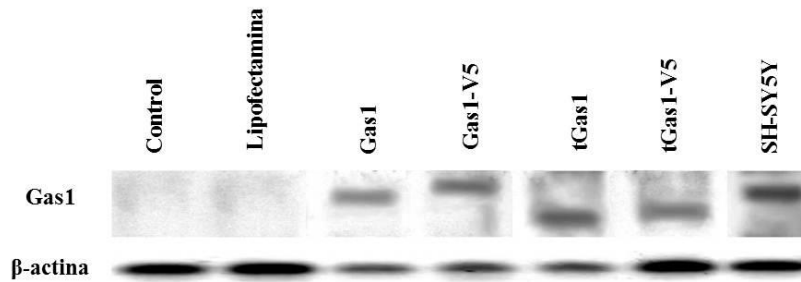


Figura 9. Presencia de la proteína tGas1 en células C6 transfectadas. Western blot contra Gas1 de las proteínas aisladas de las células C6 transfectadas. El control y las células sometidas con Lipofectamina no expresaron la proteína. tGas1 presentó un peso menor que Gas1 (-3kDa). Los epítopes V5 aumentaron el peso de la proteína en aproximadamente 1.2kDa. SHSY-5Y, línea celular que al privar de suero expresa Gas1 (control positivo). β -actina, control positivo de carga. (Modificado de López-Ornelas, et al., 2011).

Posteriormente, el medio de cultivo de cada una de las condiciones fue recolectado y aplicado como medio condicionado a células C6 en proliferación y se observó que a las 48 horas de tratamiento, la proliferación fue menor en las células que recibieron el medio con tGas1, esto a distintos volúmenes de medio (Figura 10).

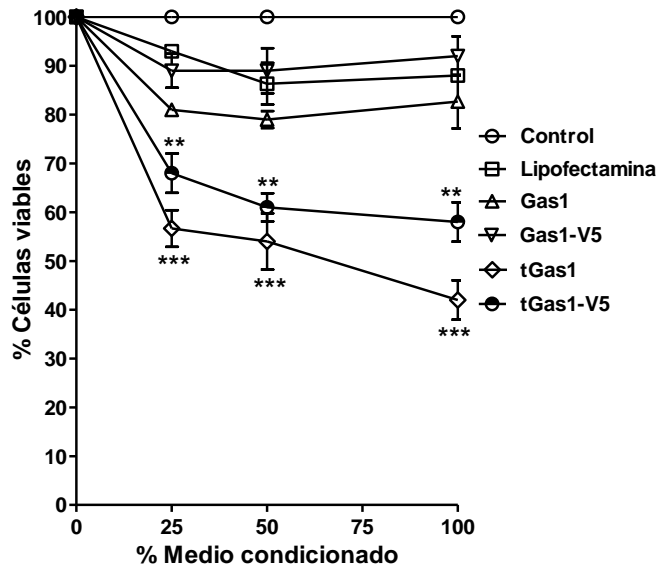


Figura 10. tGas1, con y sin epítotope V5, en el medio condicionado disminuye la viabilidad celular. Porcentaje de células viables, a las 48 horas de tratamiento con el medio condicionado, normalizado en función de las células control. El menor porcentaje de células viables, a distintos volúmenes de medio condicionado, fue en presencia de tGas1 con y sin epítotope V5. Control, células C6 que reciben el medio de las células C6 sin transfectar; Lipofectamina, células C6 que reciben el medio de las células C6 tratadas sólo con Lipofectamina 2000; Gas1 y Gas1-V5, células C6 que reciben el medio de las células C6 transfectadas con cada uno de los plásmidos con la secuencia completa de Gas1, sin y con epítotope V5, respectivamente y; tGas1 y tGas1-V5, células C6 que reciben el medio de las células C6 transfectadas con cada uno de los plásmidos con la secuencia truncada de Gas1, sin y con epítotope V5, respectivamente. Los datos representan la media \pm del error estándar. $**P<0.01$ y $***P<0.001$, con respecto al control, $n = 3$. (Modificado de López-Ornelas, et al., 2011)

Al momento de realizar la construcción de dos lentivirus, uno con la secuencia de *tGas1* y otro con la secuencia de *tGas1-V5*, e infectar células C6 en proliferación y el medio de cultivo, de 48 horas, recolectarlo y aplicarlo como medio condicionado por 48 horas a cultivos de C6 independientes, se observó que la viabilidad disminuía más en las células que recibían el medio condicionado en comparación con las infectadas. También se observó que el efecto era mayor con tGas1 sin la presencia del epítotope (figura 11).

Con los resultados de maestría, se pudo concluir que el efecto ejercido por tGas1 en la viabilidad de células C6 era de manera autocrina y paracrina.

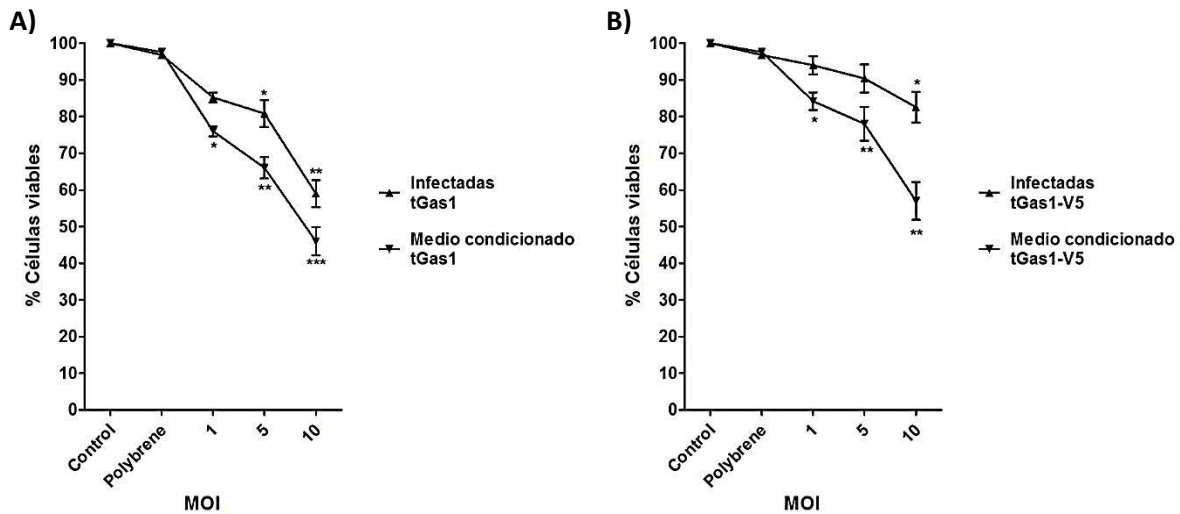


Figura 11. tGas1 disminuye la viabilidad celular de manera autocrina y paracrina. A) células C6 a las 48 horas postinfección con un lentivirus con tGas1 a distintos MOIs y células que reciben el medio condicionado, por 48 horas, de las células C6 infectadas de cada una de las condiciones. **B)** mismo protocolo que en la gráfica anterior pero empleando un lentivirus con tGas1-V5. MOI, Múltiplo de Infección; Polybrene (Invitrogen), es un dímero catiónico empleado para facilitar la infección. Los datos representan la media \pm del error estándar. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$, con respecto al control, $n = 3$. (Modificado de López-Ornelas, et al., 2011).

Relevancia de un vector lentiviral de expresión regulable con *tGas1*

Debido a que el efecto de Gas1 está dado por su extremo amino terminal, el uso de un vector lentiviral con la secuencia *tGas1* (sin la secuencia consenso para la adhesión del ancla GPI) expresa una proteína secretable, la cual tiene la capacidad de estar libre y ejercer su acción excitotóxica en la célula infectada y otras adyacentes, lo cual favorece su efecto inhibitorio en la viabilidad celular.

Los problemas que surgen con estos vectores son su inespecificidad al momento de transducir a las células, donde células no enfermas son infectadas, y el control de su expresión. Para minimizar el primer inconveniente surge la posibilidad de infectar CTNs con el transgén de interés, utilizando estas células como vehículo (Kendall, et al, 2008) y en el caso de tener una proteína secretable, ésta ejercerá su acción sobre las células cancerosas de manera autocrina y paracrina.

Para mitigar el segundo problema, existen vectores lentivirales de expresión regulable, los cuales tienen en la región promotora un operador que puede ser inhibido por una proteína represora, ésta última está presente debido a que se infecta con un lentivirus, que contiene el transgén represor (*TR*), en la célula transducida con un lentivirus de expresión regulable. La proteína represora sólo puede ser secuestrada por una molécula en particular, en la mayoría de los casos por Tetraciclina (Tet). Con estos vectores se logra una expresión del transgén en el sitio anatómico de interés y en el momento deseado por el investigador.

En el caso de tGas1 estos vectores lentivirales podrán ser empleados en dos circunstancias: la primera es con la inyección directa del lentivirus con tGas1 en un tumor, y por otro lado, coinfectar CTNs con el lentivirus con *tGas1* y su elemento represor, estas células pueden ser administradas vía torrente sanguíneo o por microinyección en zonas aledañas a un GBM implantado y esperar a que migren hacia el tumor, ya ahí, administrar Tetraciclina para inducir su expresión.

Estas estrategias plantean utilizar a Gas1 como molécula terapéutica proapoptótica cuyo efecto será localizado en las células tumorales y en las adyacentes.

Justificación

Casi la mitad de los tumores primarios del SNC son gliomas y la forma más maligna de estos es el GBM, el cual tiene como característica infiltrarse agresivamente en el parénquima cerebral.

Los tratamientos actuales para GBM incluyen: la resección quirúrgica, la quimioterapia y la radioterapia, pero incluso después de las terapias combinadas, el pronóstico sigue siendo muy pobre y con una supervivencia media de aproximadamente año y medio después del diagnóstico.

A pesar de que el conocimiento con respecto a la base genética y a las vías de señalización moleculares implicadas en el origen y la progresión de los GBMs ha aumentado significativamente en los últimos años, permitiendo la generación de nuevos agentes quimioterapéuticos que se utilizan junto con sofisticadas técnicas quirúrgicas y de radiación, nuevos enfoques terapéuticos son necesarios para el tratamiento del GBM.

La terapia génica parece ser una estrategia adecuada para el tratamiento de los GBMs, debido a que permite el suministro de genes terapéuticos a estos tumores, los cuales tienen como característica el no metastatizar. Por otro lado, una nueva herramienta en el tratamiento del GBM se ha dilucidado y ésta es mediante el uso de CTNs, las cuales presentan un tropismo innato hacia células tumorales y pueden ser empleadas como vehículo de moléculas terapéuticas.

Los estudios con Gas1 han mostrado tener un efecto antitumoral en modelos *in vitro* e *in vivo* de GBM, esto debido a que evita que las células entren a la fase S del ciclo celular e induce apoptosis, lo cual la hace una molécula con gran potencial en la terapia contra esta enfermedad.

Los resultados obtenidos durante el proyecto de maestría indican que Gas1 soluble (tGas1), sin la secuencia consenso para la adhesión del ancla GPI, tiene efecto en la viabilidad celular del GBM, tanto de manera autocrina como paracrina, pero existe la necesidad de valorar sobre qué mecanismos son los efectos de esta proteína y si puede ser aplicada en modelos *in vivo* de GBM.

Este proyecto plantea valorar el efecto antitumoral del extremo N-terminal secretable de Gas1 en una línea celular derivada de GBM de rata, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Esta proteína secretable se logrará expresar debido a la construcción de vectores lentivirales de expresión regulable que contienen la información para codificar el extremo amino de Gas1. Dicho vector tiene la secuencia de *gas1* desde el sitio de inicio en la transcripción hasta el triplete que codifica para la Arginina 315, sin incluir la información para la Serina 316 (sitio de inicio para la secuencia consenso del ancla GPI) en adelante.

Con este vector infectaremos células C6 y cuantificaremos si el efecto de tGas1 es por disminución de la proliferación celular, inducción a la apoptosis, o ambas. También se valorará su actividad antitumoral en un modelo *in vivo* de GBM.

Además, se implementará un sistema de terapia génica *ex vivo*, donde coinfectaremos este vector, junto con un lentivirus que contiene un elemento represor de la expresión, CTNs humanas y valoraremos la migración que puedan tener dichas células hacia células tumorales y que tanto se podrán utilizar como vehículo de una forma secretable y regulable de Gas1.

Hipótesis

- La sobreexpresión de tGas1 tendrá un efecto antitumoral en modelos de GBM, tanto *in vitro* como *in vivo*.
- La coinfección de un lentivirus con la secuencia para expresar la forma secretable de Gas1 y el elemento represor de su expresión en CTNs, hará que estas últimas transporten tGas1 hacia células tumorales cerebrales, ya ahí, la expresión será controlada por el uso de Tetraciclina y se observará una disminución en la proliferación del tumor.

Objetivos

Generales

- Cuantificación *in vitro* e *in vivo* del efecto inhibitorio en la proliferación celular e inductor de apoptosis del extremo amino secretable de Gas1 (tGas1).
- El empleo de células troncales neurales humanas (CTNs) como transporte de una forma secretable y regulable de Gas1 hacia tumores del SNC en ratones desnudos.

Específicos

In vitro

- Investigar si la infección con tGas1 disminuye la proliferación en células de GBM.
- Investigar si la infección con tGas1 induce apoptosis en células de GBM.
- Elaborar una línea estable de células C6 que contengan el elemento represor de la expresión y la forma secretable de Gas1.
- Obtener el número de copias virales de la línea celular estable.
- Obtener la dosis de Tetraciclina inductora de la expresión de tGas1 en la línea celular estable.
- Comprobar la expresión del transgén y la presencia de la proteína en la línea celular estable y medio condicionado, respectivamente.

In vivo

- Investigar el efecto inhibidor tumoral *in vivo* de tGas1 en GBM.
- Comprobar la regulación transcripcional de tGas1 *in vivo*.
- Demostrar la expresión génica y proteica de tGas1 en los tumores implantados.

CTNs

- Implantar células derivadas de GBM en un hemisferio cerebral de ratones desnudos y la posterior implantación de CTNs coinfectadas con tGas1 y un elemento represor de la expresión en el hemisferio cerebral contralateral.
- Administración de Tetraciclina al momento que las CTNs migren hacia el tumor para inducir la expresión de tGas1.
- Investigar el efecto antitumoral posterior al tratamiento con CTNs.

Metodología

Línea celular de GBM

Se empleó la línea C6 de GBM, desarrollada por la administración repetida de metilnitrosourea en ratas adultas Wistar-Furth, la cual se obtuvo de la compañía ATCC (CCL-107). Las células se cultivaron en medio DMEM (*Dulbecco Modified Eagle's Medium*)/F12 (Invitrogen) suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10% y antibióticos (Penicilina 100 U/ml y Estreptomina 100 mg/ml) (In Vitro). Este último medio fungió como medio de crecimiento para las células C6.

Cuantificación de la viabilidad celular

Se realizó mediante la técnica de azul de tripano (Sigma-Aldrich), la cual excluye a las células vivas de las muertas dependiendo de la integridad de la membrana celular. Las células sometidas a dicha técnica fueron despegadas de su caja de cultivo, empleando Tripsina (Invitrogen), y resuspendidas en 1 ml de medio, posteriormente se tomaron 10 μ l y fueron resuspendidos en 80 μ l de medio y 10 μ l de azul de tripano y se dejó incubar por 3 minutos. La solución con las células fue colocada en una cámara de Neubauer y se contaron las células viables (blancas) y no viables (azul) empleando la siguiente fórmula; Células viables / ml = (células sin teñir) (10) (10,000), en donde, el 10 corresponde al factor de dilución y el 10,000 corresponde al volumen de la cámara de Neubauer.

Infección de células C6 con los lentivirus con el transgén *tGas1*

Para los experimentos *in vitro*, las células C6 fueron sembradas a una densidad de 1×10^6 en cajas de 60 mm y se esperó a que alcanzaran una confluencia del 30-50%,

posteriormente se infectaron con un lentivirus con *tGas1* (tesis de maestría de López, 2007), con un MOI (Múltiplo de Infección) de 1-10 en la presencia de Polybrene (Sigma-Aldrich), 6 µg/ml, y a las 24 horas el medio de cultivo fue cambiado por medio fresco. Otros cultivos de células C6 fueron infectadas con un lentivirus con *tGas1-V5* (tesis de maestría de López, 2007), este transgén contiene la información para expresar una proteína tGas1 fusionada al epítipo V5. A las 48 horas el medio de cultivo fue recolectado, filtrado (membranas de 0.22 µm, Millipore) y aplicado como medio condicionado a células C6 sembradas a una densidad de 5×10^5 en cajas de 35 mm y se dejó el tratamiento por 48 horas. La viabilidad celular, tanto de las células infectadas como de las células que recibieron el medio condicionado, fue evaluada con la técnica de azul de tripano.

La estrategia de emplear una proteína Gas1 fusionada al epítipo V5 se realizó, ya que en el caso de estudios *in vivo* uno podría distinguir la expresión de Gas1 exógeno del endógeno.

Incorporación de BrdU (Proliferación celular)

Posterior a las 48 horas, las células C6 infectadas y las que recibieron el medio condicionado fueron incubadas con 50 mM de BrdU (Bromodesoxiuridina o 5-bromo-2-desoxiuridina, el cual es un nucleótido sintético análogo de la timidina) (Roche) durante 6 horas a 37°C. Un kit de tinción de BrdU (Invitrogen) fue utilizado según las instrucciones del fabricante:

1. Se fijaron las células con 70% de alcohol por 30 minutos a 4°C.
2. Se incubó a las células con la solución desnaturalizante por 30 minutos, después se lavaron las muestras con PBS ("Buffer" fosfato salino al 1% en H₂O, pH 7.4) (2 min, 3 veces).

3. Se aplicó la solución de bloqueo por 10 minutos y se incubó a temperatura ambiente.
4. Se incubó con el anticuerpo de ratón biotinilado anti-BrdU a temperatura ambiente por 60 minutos, posteriormente se lavaron las muestras con PBS (2 min, 3 veces)
5. Se incubó por 10 minutos con el anticuerpo contra la Estreptavidina-Peroxidasa a temperatura ambiente y se lavaron las muestras con PBS (2 min, 3 veces).
6. Se dejó incubando con la Diaminobencidina (DAB) por cinco minutos y se lavaron las muestras 3 veces con agua destilada.
7. Se contratiñeron las células con hematoxilina durante dos minutos y se lavaron con agua destilada 3 veces.
8. Se montaron los cubreobjetos con Vickel y fueron observados al microscopio de campo claro (Olympus Bx-51).

Posteriormente, la proliferación celular fue analizada contando las células que incorporaron BrdU, un total de 200 a 300 células por laminilla fueron examinadas.

Ensayo de apoptosis

El número de células que sufrieron apoptosis fue determinado mediante la detección de TUNEL (Marcación de Cortes Terminales con dNTP-biotinilados mediada por TdT) (ROCHE). Se realizó el ensayo a las 48 horas en las células infectadas (con el lentivirus con *tGas1* y *tGas1-V5*) y en las que recibieron el medio condicionado por 48 horas. Brevemente:

1. Con las células en los cubreobjetos, se empleó la solución fijadora por una hora a temperatura ambiente y posteriormente se lavó con PBS (2 min, 3 veces).
2. Se incubó con la solución de bloqueo por 10 minutos a temperatura ambiente y se lavó con PBS (2 min, 3 veces).

3. Se incubó con la solución permeabilizadora en hielo por 2 minutos y se lavó con PBS.
4. Se incubó con la mezcla de TUNEL (TdT y fluoresceína-dUTP), a 37°C por una hora y en la oscuridad y se lavaron las muestras con PBS.
5. Se observaron las muestras al microscopio de epifluorescencia (Olympus Bx-51), donde se contaron veinte campos de tres experimentos independientes.

Obtención de una línea estable de C6 con un elemento represor de la expresión (TR) y la forma secretable de Gas1 (*tGas1*)

La obtención de una línea C6 estable se realizó mediante la primoinfección de células C6, sembradas a una confluencia del 30-50% en cajas de 60 mm, con un lentivirus con la secuencia del elemento represor de la expresión (TR) (tesis de maestría de López, 2007) empleando un MOI de 10 y la posterior selección de las células transducidas con Blastidina (Invitrogen), 5 µg/ml, en el medio de cultivo durante dos semanas, se realizó cambio de medio cada tercer día para evitar la degradación del antibiótico de selección. La línea celular estable obtenida posteriormente fue transducida con un lentivirus con la secuencia de *tGas1* (MOI de 10) y las células infectadas fueron seleccionadas con Zeocina (Invitrogen), 100 µg/ml, y Blastidina durante dos semanas.

Obtención de la dosis de Tetraciclina inductora de la expresión de tGas1 en la línea C6 estable

La línea celular estable se sembró a una densidad de 1×10^6 en cajas de 60 mm con medio de crecimiento, a las 24 horas se le administró Tetraciclina a una dosis de 1 o 2 µg/ml y a las 48 horas se le cuantificó la viabilidad celular. El medio de cultivo fue

administrado como medio condicionado a células C6 en proliferación y se cuantificó la viabilidad celular de cada una de las dosis a las 24, 48 y 72 horas.

Cuantificación de apoptosis y disminución de la proliferación celular en la línea C6 estable

La línea celular estable fue cultivada en medio de crecimiento con antibióticos de selección (Blasticidina y Zeocina). Se sembraron 1×10^6 células en cajas de 60 mm y se dejaron crecer por 48 horas en presencia de Tetraciclina, $2 \mu\text{g/ml}$, para posteriormente realizarles los ensayos de TUNEL e incorporación de BrdU. El medio de cultivo fue recolectado y aplicado como medio condicionado a células C6 que fueron sembradas a una densidad de 5×10^5 en cajas de 35 mm. A las 48 horas también se realizaron los ensayos de TUNEL e incorporación de BrdU.

Comprobación de la expresión del transgén y de la proteína

RT-PCR

Se aisló el ARN por técnica de Tripure (Invitrogen) a las células tanto transfectadas como infectadas y dicho ARN fue transcrito a ADN por medio de la Transcriptasa Reversa M-MLV (Invitrogen). Bajo el siguiente protocolo.

1. Se mezclaron los siguientes componentes en un tubo de microcentrífuga:

1 μl oligo (dT)
1 μl (5 μg) de ARN total
1 μl 10 mM dNTP Mix
8 μl de H₂O destilada

2. Se calentó la muestra a 65°C por 5 minutos y posteriormente se colocó en hielo. Se le añadió 4 µl del 5X First-Strand Buffer, 2 µl 0.1 M DTT y un 1 µl de RNaseOUT (Inhibidor de ribonucleasa).
3. Se incubó por 2 minutos a 37°C.
4. Se añadió 1 µl (200 unidades) de M-MLV TR y se incubó por 10 minutos a 24°C.
5. Se incubó por 50 minutos a 37°C.
6. Se inactivó la reacción incubando a 70°C por 15 minutos.

Para la amplificación del transgén *tGas1* se emplearon los siguientes oligonucleótidos:

Sentido: 5'- CACCGCGATGGTGGCCGC -3'

Antisentido: 5'- ATACCCGGACCCGCGTCC -3'

Bajo las siguientes condiciones en el termociclador (Axygene) y esquema de reactivos:

Reactivo	Cantidad
ADNc	2.0 µl (50ng)
Buffer 10X	5.0 µl
dNTPs	0.5 µl (25 mM)
Oligonucleótido sentido	1.0 µl (200 nM)
Oligonucleótido antisentido	1.0 µl (200 nM)
Agua	33.5 µl
MgCl ₂	1.5 µl (1.5 mM)
DMSO	5.0 µl
Taq polimerasa	0.5 µl (1 unidad)

Condiciones de PCR en el termociclador.	
94°C/ 5 minutos	un ciclo
94°C/ 1 minuto	35 ciclos
62°C/ 1 minuto	
72°C/ 1 minuto	
72°C/ 10 minutos	un ciclo

Western blot

La extracción de proteínas se realizó siguiendo el manual del Kit comercial TriPure. La cuantificación de proteínas fue hecha por el método de ácido bicinonínico (Pierce) en placas de ELISA con una lectura de absorción de 540nm. La técnica que se empleó se enlista a continuación:

1. Se lisaron las muestras, se centrifugaron 5 minutos a 1500 rpm y se recolectó el medio.
2. Se añadió el buffer de carga; 200 microlitros de muestra y 100 microlitros de buffer 4x.
3. Se añadió DTT y β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich), para reducir los enlaces disulfuro existentes.
4. Se guardaron las muestras a -20°C . Se mantuvieron a cuatro grados durante la manipulación.
5. Se preparó un gel de poliacrilamida (Sigma-Aldrich) al 10%.
6. Se calentaron las muestras 5 minutos a 90°C .
7. Se cargaron las muestras en el gel.
8. Realizamos la electroforesis y corrimos el gel con un buffer de tris-glicina a 120 V.
9. Se realizó la transferencia hacia la membrana de nitrocelulosa (BIO-RAD). Posteriormente se hizo un electroblotting a 400 amp.
10. Se apartó la membrana.
11. Se hizo un lavado de la membrana usando TBS ("Buffer" Tris, con HCL, salino al 1% en H_2O , pH 7.4).
12. Se bloqueó la membrana con suero de leche descremada al 5 por ciento durante una hora a 37°C .
13. Se añadió el anticuerpo primario policlonal de Gas1 (Proscience) (Zamorano, et al, 2003) a una dilución de 1:200 y se incubó por 12 horas a 4°C .
14. Se lavó con solución TBS.

15. Se añadió el anticuerpo secundario (anticonejo) (Jackson ImmunoResearch) a una dilución de 1:4000 y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente.
16. Se lavó con solución TBS.
17. Se reveló con el Kit comercial ECL (PerkinElmer) y con placas para revelado Kodak (Ortocromática tipo 3).
18. Se analizaron las placas en el transiluminador UV, BioDoc-It (UVP) y las fotografías fueron tomadas empleando el programa LabWorks (BioImaging Systems).

Inmunocitoquímica

Se sembraron 1×10^6 células estables productora de tGas1 en cajas de 60 mm y se dejó que alcanzaran una confluencia del 80-90%, posteriormente fueron divididas en tres grupos: uno recibió Tetraciclina, el segundo no recibió Tetraciclina y el último grupo consistió en células C6 no transducidas. Después de 48 horas en cultivo, las células fueron fijadas con 4% de *p*-formaldehído preparado en PBS (pH7.4) e incubadas durante 12 horas con el anticuerpo primario policlonal contra Gas1 (ProSci) a una dilución de 1:200.

El anticuerpo secundario empleado era un biotilado anti-conejo (Vector Laboratories) a una dilución de 1:300 y se incubó por una hora. La proteína fue revelada con fluoresceína estreptavidina (Vector Laboratories) a una dilución de 1:200 durante 50 minutos y las células fueron contrateñidas con DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) (Vector Laboratories) para visualizar los núcleos. Las células se observaron al microscopio de epifluorescencia (Olympus Bx-51) y las fotografías fueron tomadas empleando el programa Image-Pro Plus versión 4.5 (MediaCybernetics).

Como control positivo y negativo se emplearon células SH-SY5Y (neuroblastoma humano) en la presencia y ausencia de suero. Dichas células expresan Gas1 a las 24 horas

de privación de suero. Fueron crecidas en medio DMEM alto en glucosa con 10% de SFB y 1% de Penicilina/Estreptomicina.

Número de copias virales de la línea C6 estable por técnica de Southern blot

Se obtuvo el ADN genómico de las células C6 estables, como control se usaron células C6 no estables, y fue digerido con la endonucleasa de restricción XbaI. Posteriormente, el ADN se corrió en un gel de agarosa (Sigma-Aldrich) al 0.6%.

El ADN fue transferido a una membrana de nylon (Amersham) e hibridado con una ribosonda acoplada a dioxigenina transcrita con T7 (Epicentre, AmpliScribe T7, T3 and SP6 High Yield Transcription Kits), elaborada a partir del vector plasmídico con *tGas1*, durante 18 horas a 60°C. La membrana fue incubada con un anticuerpo anti-dioxigenina (1:5000) por 12 horas. Por último, la membrana fue revelada usando un Western Lightning Plus-ECL Kit (PerkinElmer) y las imágenes fueron capturadas en un Sistema de imagen BioDoc-It (UVP).

Efecto *in vivo* del lentivirus con *tGas1*

Los experimentos *in vivo* se realizaron de acuerdo con la actual legislación mexicana NOM-062-ZOO-1999 (SAGARPA) y con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de la Salud de EE.UU. (NIH) y las directrices internas del Cinvestav.

El día de la cirugía, ratones desnudos (*nu/nu*) de 4-6 semanas fueron anestesiados por la administración intraperitoneal (ip) de ketamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg) y se les implantó en el flanco derecho 1×10^6 células C6. Cuando el tumor alcanzó un

diámetro de 4x5 mm, los ratones fueron divididos en tres grupos ($n = 5$, por grupo): al primer grupo se le inyectaron 3 dosis de 5×10^5 partículas virales (pv), resuspendidas en 100 μ l de medio DMEM/F12, con la secuencia de *tGas1*; al segundo grupo se le inyectaron 5×10^5 pv de un lentivirus con la secuencia de *LacZ* (control de infección) y al tercer grupo se le administraron 100 μ l de medio DMEM/F12 (vehículo), cada dosis fue administrada intratumoralmente (it) cada tercer día y el diámetro del tumor fue medido, con un calibrador vernier, cada tercer día por 10 días. Posteriormente, los animales fueron profundamente anestesiados y sacrificados y los tumores fueron disecados. Por último, a los tumores extraídos se les aisló el ARN y las proteínas, bajo el protocolo anteriormente descrito, para ensayos de RT-PCR y western blot, respectivamente.

El volumen tumoral se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación: $V = \frac{(D_{max} - D_{min})^2}{2}$; donde D_{max} y D_{min} representan el diámetro más grande y más pequeño, respectivamente.

Expresión regulable de *tGas1* por Tetraciclina en un modelo *in vivo* de glioblastoma

A ratones desnudos de 4-6 semanas se les anestesió e implantó en el flanco derecho una mezcla de células: el 50% (5×10^5) fueron células C6 y el otro 50% (5×10^5) fueron células C6 estables (con el *TR* y *tGas1*). Posteriormente, se dejó crecer el tumor hasta que alcanzó un diámetro de 4 x 5 mm. Se dividió a los ratones en 2 grupos ($n = 5$, por grupo): a uno se le inyectó 3 dosis vía it de Tetraciclina, 2 mg/kg resuspendida en 100 μ l de solución salina, y a otro grupo sólo se le inyectó, vía it, 100 μ l de vehículo. Cada dosis fue administrada cada tercer día y el diámetro del tumor fue medido cada tercer día por 10 días. Por último, los animales fueron profundamente anestesiados y sacrificados y los tumores fueron disecados.

Uso de CTNs como vehículo de una forma secretable y regulable de tGas1

Línea de CTNs

Se empleó la línea celular humana ReNcell CX (Millipore), la cual es derivada de la región cortical de un feto humano de 10 semanas de gestación e inmortalizada por la infección retroviral del oncogén c-myc. Dicha línea puede diferenciarse a neuronas o células gliales.

La línea celular fue sembrada en cajas de Petri con un sustrato, Laminina 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Sigma-Aldrich), el cual se dejó incubando a 37°C durante 24 horas antes de sembrar las células. Las células fueron crecidas en un medio comercial (medio ReNcell, Millipore) con la presencia del bFGF (Factor básico de Crecimiento de Fibroblastos, Sigma-Aldrich) a una concentración de 20 ng/ml y del EGF (Sigma-Aldrich) a una concentración de 20 ng/ml. Dichos factores evitan que las células se diferencien. El medio de cultivo fue cambiado cada tercer día para evitar la degradación de los factores de crecimiento.

Infección de las CTNs con un retrovirus con la Proteína Verde Fluorescente (GFP)

Para observar la migración de las CTNs hacia el tumor, se decidió visualizarlas mediante la fluorescencia de la GFP. Las células tumorales expresaron constitutivamente la proteína roja fluorescente (PRF) y las CTNs expresaron constitutivamente la GFP.

Las CTNs fueron infectadas durante 24 horas con un retrovirus con la secuencia de la *gfp* (Lara, et al., 2012) con un MOI de 40, posteriormente se cambió el medio de cultivo y a las 72 horas post-infección fueron seleccionadas mediante citometría de flujo (laboratorios centrales, Cinvestav Zacatenco). Por último, se observó a las células fluorescentes mediante microscopía de epifluorescencia.

Citometría de flujo

Las CTNs infectadas con el retrovirus con la *gfp* fueron tripsinizadas y resuspendidas en un ml de PBS 1X, pH 7.4, con 5mM de EDTA. Posteriormente, las células fueron separadas por el citómetro de flujo (Moflo High Performance cell sorter, Beckman-Coulter) y se seleccionaron las células verdes (longitud de onda de 509 nm). Por último, las células verdes fluorescentes fueron sembradas en cajas de 35 mm con medio de crecimiento con el doble de concentración de Penicilina, 200 U/ml, y Estreptomina, 200 mg/ml.

Células productoras del retrovirus y construcción retroviral

La línea celular empleada para el empaquetamiento de los retrovirus fue la 293ft (células de Riñón Embrionarias Humanas, HEK) (Invitrogen). Las células fueron sembradas en cajas de 100 cm y se cultivaron en un medio DMEM alto en glucosa, con 10% de suero fetal bovino activado, 0.1mM MEM aminoácidos no esenciales (Invitrogen), 6mM de L-glutamina (Invitrogen), 1mM de Piruvato de Sodio (Invitrogen) y 1% de penicilina estreptomina.

El retrovirus con la secuencia *gfp* se construyó transfectando con Lipofectamina 2000 y medio Opti-MEM (Invitrogen) las células 293ft, al 90% de confluencia, con 3 plásmidos:

1. pCMV-gp, con las secuencias para expresar la proteína gag (cápside viral) y la enzima pol (para la replicación e integración viral).
2. pCMV-vsv-g, para expresar la glicoproteína de envoltura del virus de la estomatitis vesicular.
3. pCAG-GFP/cre3, que lleva la secuencia de la GFP.

A las 5 horas de transfección, el medio Opti-Mem con los complejos catiónicos fue cambiado por medio de crecimiento y a las 48 horas posteriores a la transfección los virus fueron recolectados del medio de cultivo, para ello, se centrifugó el medio a 3000 rpm a 4°C por 5 minutos y se filtró por una membrana de 0.45 µm. Los virus fueron almacenados a -80°C

Infección de las CTNs verdes fluorescentes con dos lentivirus: uno con la secuencia del *TR* y otro con la secuencia de *tGas1*

Para este apartado fueron empleados otros lentivirus a los anteriormente usados en este proyecto, dichos lentivirus son de nueva generación y presentan básicamente dos ventajas en comparación con los previos: 1) se obtienen en mayor cantidad y 2) la expresión de la proteína es mayor.

Las nuevas propiedades de estos virus, con respecto a los anteriores, radican en que poseen dos nuevos elementos:

1. Una secuencia cPPT (tracto de Polipurinas del VIH) que incrementa el título viral.
2. Una secuencia WPRE (*Woodchuck Posttranscriptional Regulatory Element*) la cual incrementa la expresión de la proteína.

Para la construcción de estos lentivirus de nueva generación, primero se hizo una recombinación homóloga bajo el siguiente protocolo:

1. El plásmido pENTR/D-TOPO/tGas1 (tesis de maestría de López, 2007), el cual tiene la secuencia secretable de Gas1, fue recombinado homológamente con el plásmido pLenti6.3/TO/V5-DEST (Invitrogen).

Debido a que el plásmido pENTR/D-TOPO/tGas1 cuenta con la secuencias *attL* derivadas del bacteriófago lambda, éste se puede recombinar de manera homóloga con el vector de construcción lentiviral (pLenti6.3/TO/V5-DEST) debido a que cuenta con las secuencias *attR* derivadas del mismo bacteriófago. Por otro lado, el vector de construcción lentiviral tiene el gen *ccdB*, el cual expresa una proteína que funge como bacteriostático e impide el crecimiento de la bacteria que la exprese al momento de llevar a cabo la recombinación. El gen *ccdB* es intercambiado al plásmido pENTR/D-TOPO/tGas1, evitando así el crecimiento de las bacterias que lo llevan (figura 12).

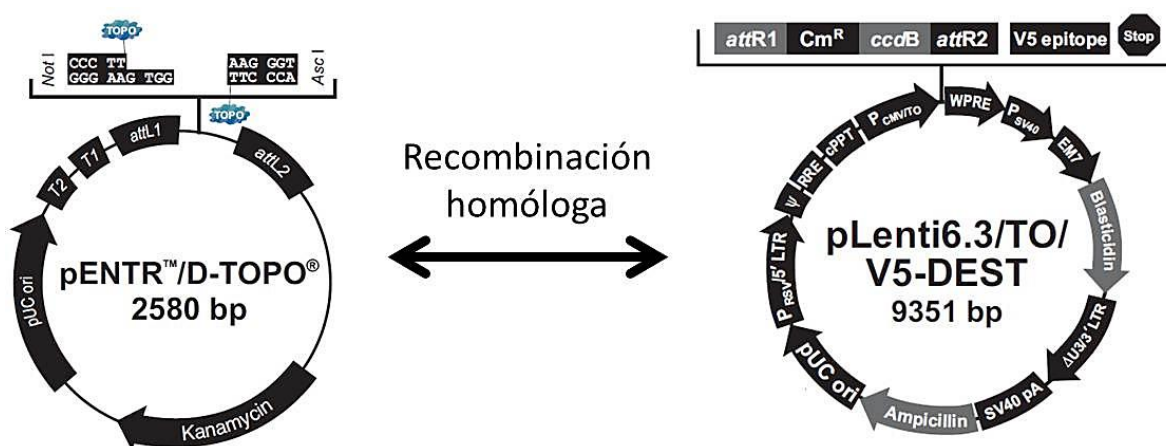


Figura 12. Obtención del plásmido de construcción lentiviral. El plásmido pENTR/D-TOPO/tGas1 es recombinado con el plásmido pLenti6.3/TO/V5-DEST, dicho plásmido ya contiene las secuencias necesarias para la construcción de un lentivirus y contiene un operador de Tetraciclina en su promotor CMV.

La recombinación se llevó a cabo mediante el siguiente esquema:

- A. Se mezclaron los componentes abajo señalados a temperatura ambiente.

Componente	Muestra
Vector de entrada (150 ng)	1 µl
Vector de construcción lentiviral (pLenti6.3/TO/V5-DEST)	1 µl
Buffer TE, pH 8.0	6 µl

- B. A la muestra se le añadieron 2 μ l de la enzima LR Clonasa (Invitrogen) y se dejó incubar a 25°C por 12 horas.
- C. Se agregó 1 μ l de Proteinasa K (Invitrogen) y se incubó por una hora a 37°C, con la finalidad de inactivar a la enzima.
- D. Se transformaron los plásmidos recombinados en bacterias *E. coli* One Shot Stbl3 (Invitrogen) usando como antibiótico de selección Ampicilina.
 - 2. El plásmido fue mapeado con la enzima de restricción *Apa*I (New England Biolabs) y se obtuvieron los fragmentos esperados.

Protocolo de construcción lentiviral

Se empleó la línea celular 293ft para el empaquetamiento, la cual fue sembrada en medio de crecimiento y se esperó a que alcanzara una confluencia del 90%. El día de la transfección se siguió el siguiente protocolo:

- 1. Se prepararon los complejos DNA-Lipofectamina como a continuación se describe:
 - A. En un tubo de 5 ml, se diluyó 9 μ g de la mezcla de empaquetamiento viral (Invitrogen), dicha mezcla contiene los plásmidos con el elemento gag/pol (Integrasa/Transcriptasa reversa), el elemento VSV (envoltura del Virus de la Estomatitis Vesicular) y el elemento Rev (proteína cariofílica), todos estos elementos necesarios para la construcción del lentivirus, y 3 μ g del plásmido de construcción lentiviral con la secuencia de *tGas1* (12 μ g en total), se diluyeron en 1.5 ml de medio Opti-Mem sin suero. Se formaron 2 complejos, para la posterior construcción de 2 lentivirus; un virus con la información para *tGas1* y un virus con el *TR*.
 - B. En otro 2 tubos se mezcló en cada uno 36 μ l de Lipofectamina 2000 con 1.5 ml de medio Opti-Mem sin suero y se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos.

- C. Se combinó el ADN diluido con la Lipofectamina (3 ml en total) y se incubó cada muestra 20 minutos a temperatura ambiente.
2. Mientras los complejos ADN-Lípido se formaban, se tripsinizaron (Invitrogen) las células 293ft y se contaron, para posteriormente ser resuspendidas a una densidad de 1.2×10^6 /ml en medio de crecimiento con suero y sin antibiótico.
 3. Se añadieron los complejos de ADN-Liposomas en un plato de 10 cm con 5 ml de medio de crecimiento con suero sin antibiótico.
 4. Se agregaron 5 ml de células (6×10^6) al plato contenedor de los complejos lipocatiónicos y se incubó a 37°C por 5 horas.
 5. Se aspiró el medio y se lavaron las células con medio de crecimiento para al final administrar 10 ml de medio de crecimiento con antibiótico y suero e incubar por 48 horas a 37°C .
 6. Para la colecta de los lentivirus, el medio de cultivo fue recolectado en tubos de 15 ml.
 7. Se centrifugó el medio a 3000 rpm a 4°C por 5 minutos.
 8. Se filtró el medio con membranas de $0.45 \mu\text{m}$.
 9. Se obtuvieron alícuotas de 1 ml para cada uno de los lentivirus y fueron congeladas a -80°C .

Infección lentiviral en las CTNs

Se sembraron 5×10^5 células ReNcell estables con la GFP (ReNcell-GFP) en cajas de 60 mm con el sustrato Laminina y al día siguiente fueron infectadas con el lentivirus que codifica la expresión del *TR* regulado por Tetraciclina, MOI de 40. A las 24 horas, el medio con los lentivirus fue aspirado y se aplicó medio de crecimiento con Geneticina (Invitrogen) ($100 \mu\text{g/ml}$) durante 2 semanas. Después, esta línea celular fue infectada con

un lentivirus con la secuencia de *tGas1* (MOI de 40) y seleccionada durante 2 semanas con Blastidina (5 µg/ml) y Geneticina (100 µg/ml). El medio de crecimiento con antibióticos de selección fue cambiado cada tercer día para evitar la degradación de los mismos.

Elaboración de una línea estable de células C6 con la Proteína Roja Fluorescente

Las células C6 fueron crecidas en medio DMEM-F12 con 10% de SFB y 1% de Penicilina-Estreptomicina. Se transfectaron, usando Lipofectamina 2000, con el plásmido pDsRed1 (donado por el Dr. Daniel Martínez-Fong) y a las 48 horas post-transfección fueron seleccionadas por citometría de flujo (longitud de onda de 583 nm). Posteriormente fueron crecidas en medio de cultivo con la presencia de antibiótico de selección (Geneticina, 500 µg/ml) y observadas al microscopio de epifluorescencia.

Viabilidad de las CTNs y las células C6

Se sembraron las dos líneas estables de CTNs: células ReNcell estables con la GFP, *tGas1* y el TR (ReNcell-GFP/*tGas1*/TR) y ReNcell-GFP, a una densidad de 1×10^6 en cajas de 60 mm y se dejaron crecer por 24, 48 y 72 horas con la presencia o ausencia de Tetraciclina en el medio de cultivo, 2 µg/ml. Posteriormente, se cuantificó la viabilidad celular a cada uno de los tiempos por técnica de azul de tripano.

El medio de cultivo de las 48 y 72 horas fue recolectado, filtrado y aplicado como medio condicionado a células C6 estables con la PRF (C6-pDsRed1), sembradas a una densidad de 5×10^5 en cajas de 35 mm, por 24, 48 y 72 horas. Por último, se les cuantificó la viabilidad celular.

Proliferación de las CTNs (productoras de tGas1) y de las células C6 (receptoras de tGas1)

Se cuantificó la proliferación celular, por ensayo de incorporación de BrdU, de las ReNcell-GFP y de las ReNcell-GFP/tGas1/TR a las 72 horas de cultivo, con la presencia o ausencia de Tetraciclina. También se cuantificó la proliferación celular de las C6-pDsRed1 que recibieron el medio condicionado por 72 horas de cada una de las condiciones mencionadas anteriormente. Técnica mencionada en apartado de incorporación de BrdU.

Apoptosis en las CTNs y en las células C6

Se cuantificó la apoptosis, por técnica de TUNEL, de las ReNcell-GFP y de las ReNcell-GFP/tGas1/TR a las 72 horas de cultivo, con la presencia o ausencia de Tetraciclina. También se cuantificó la apoptosis de las C6-pDsRed1 que recibieron el medio condicionado por 72 horas de cada una de las condiciones mencionadas anteriormente. Técnica mencionada en ensayo para apoptosis.

Implantación intracraneal de células C6 y CTNs en ratones desnudos

A ratones desnudos de 4-6 semanas se les anestesió e inyectó en el hemisferio cerebral derecho (en el estriado, Bregma AP: + 0.5 mm; ML: 2 mm y DV: 3 mm) (Paxinos y Watson) 1×10^6 células C6-pDsRed1, a los siete días de crecimiento del tumor se dividió a los ratones en 4 grupos ($n = 7$, por grupo):

1er. grupo.- Sólo se le administraría Tetraciclina a los 14 días posteriores a la implantación de las células C6-pDsRed1.

2do. grupo.- Se le inocularon en el hemisferio cerebral contralateral (Bregma AP: + 0.5 mm; ML: 2 mm y DV: 3 mm) 5×10^5 células ReNcell-GFP.

3er. grupo.- Se le inoculó 5×10^5 células ReNcell-GFP/tGas1/TR.

4to. grupo.- Se le inocularon 5×10^5 células ReNcell-GFP/tGas1/TR.

Posteriormente, se permitió que las células migraran por siete días para después administrarles vía ip Tetraciclina, 50 mg/kg/día, por 7 días a los grupos 1, 2 y 4. El grupo 3 sólo recibió el vehículo de la Tetraciclina, solución salina (300 μ l). Se les administró Tetraciclina, como control, al primer y segundo grupo debido a que existen reportes que sugieren que la Tetraciclina *per se* tiene un efecto antitumoral (Meng, et al., 2000).

Por último, se anestesió profundamente a los animales y fueron perfundidos con solución salina conteniendo Heparina, 100 U/ml y fijados con 4% de *p*-formaldehído preparado en PBS (pH7.4). Se valoró la migración mediante epifluorescencia y se cuantificó el volumen tumoral por técnica de Hematoxilina y Eosina (figura 13).

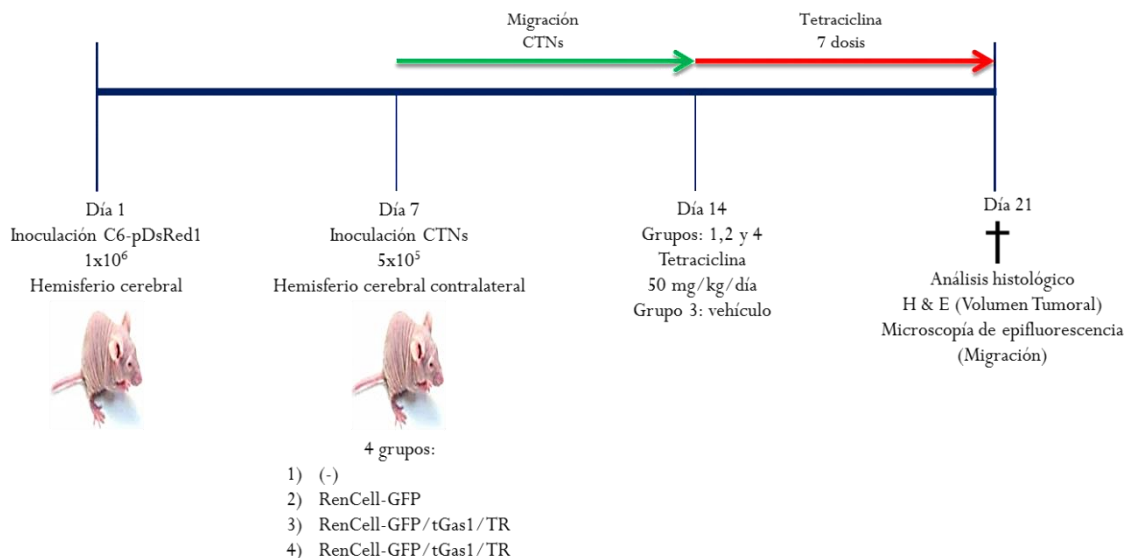


Figura 13. Esquema del protocolo en el modelo *in vivo* de GBM usando CTNs. Esquema que abarca desde el momento de implantación del tumor en ratones desnudos hasta el día que son sacrificados (†), se observan los 4 grupos con sus distintos tratamientos. Por grupo fueron empleados 7 ratones.

Por otro lado, a dos ratones de cada grupo se les disecó la masa tumoral para extracción de ARN y proteínas, como se señaló anteriormente, para comprobar la expresión del gen *tGas1s* y la proteína tGas1, respectivamente.

Para amplificar el transgén se emplearon oligonucleótidos internos exclusivos del *Gas1* humano (sentido, HGAS474, 5' CTGTGCCTGATGGCGCTGCTGC 3' y antisentido, HGAS728, 5' ATGAGGGCCGAGATGCAGTGACTC 3'), con la finalidad de distinguirlo del *Gas1* endógeno del ratón. Se empleó el mismo protocolo en el termociclador anteriormente descrito pero con una temperatura de alineamiento de 55°C.

Valoración del volumen tumoral

Con un microtomo (Leica), se realizaron cortes coronales de 30 µm de los cerebros y fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina. Los volúmenes tumorales fueron calculados empleando el programa aidScans 4.5 (AnyIntelli). Para cada ratón fueron empleados un total de 40-50 cortes, los cuales abarcaban desde el sitio de inicio del tumor (cortes anteriores) hasta el último corte donde se apreciaba el tumor (cortes posteriores). Las fotografías fueron subidas al programa y de cada una se cuantificó el volumen delimitando las zonas tumorales teñidas con Hematoxilina (morado), el volumen es obtenido por el programa.

Ganancia ponderal

Todos los ratones fueron pesados por primera vez al momento de inocularles las células C6-pDsRed1 en el hemisferio cerebral y fueron pesados nuevamente antes de ser sacrificados (3 semanas después). Esto con la finalidad de evaluar el estado de caquexia de cada uno de los grupos.

Curva de supervivencia Kaplan-Meier

Se emplearon un total de 19 ratones y se les inoculó en el hemisferio cerebral (en el estriado, Bregma AP: + 0.5 mm; ML: 2 mm y DV: 3 mm) las células C6-pDsRed1, 1×10^6 células, a la semana se dividió a los ratones en tres grupos: el primero ($n = 6$) no fue inoculado; y al segundo ($n = 6$) y tercero ($n = 7$) se les inoculó en el hemisferio cerebral contralateral (Bregma AP: + 0.5 mm; ML: 2 mm y DV: 3 mm) las células ReNcell-GFP/tGas1/TR, 5×10^5 células. A la segunda semana, el primer y tercer grupo recibieron Tetraciclina vía ip, 50 mg/kg/día, por 7 días. Por último, los ratones fueron observados, pesados y censados hasta el día de su muerte.

Análisis estadísticos

Se empleó el programa de análisis estadístico y de gráficas, GraphPad Prism (versión 5.0). En todos los análisis, con excepción de la curva de supervivencia, se empleó ANOVA unifactorial con análisis post-hoc de Tukey. Para la curva de supervivencia se empleó la prueba log-rank (Mantel-Cox) para grupos independientes y desbalanceados. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

In vitro

La sobreexpresión de *tGas1* en células de glioblastoma, mediada por infección, disminuye la proliferación celular

Por medio de un ensayo de incorporación de BrdU, se observó que la sobreexpresión de *tGas1* en células C6 disminuye la proliferación celular a las 48 horas postinfección, tanto en células infectadas como en células C6 que reciben el medio condicionado con la proteína tGas1 por 48 horas (figura 14). Se observó que la disminución era directamente proporcional al MOI empleado y que el efecto era mayor con el lentivirus *tGas1* con un MOI de 10, motivo por el cual, de aquí en adelante, se empleó sólo el lentivirus con *tGas1*, sin incluir el epítipo V5, y el MOI utilizado fue de 10. Se corroboró la expresión de los transgenes y de las proteínas por RT-PCR y western blot, respectivamente, de las células C6 infectadas con un MOI de 10 (figura 15).

La sobreexpresión de *tGas1* en células de glioblastoma induce apoptosis

Empleando la técnica de TUNEL, se observó que la sobreexpresión de *tGas1*, mediada por infección, indujo apoptosis a las 48 horas postinfección, tanto en las células C6 infectadas, MOI de 10, como en las células C6 en proliferación que recibieron el medio condicionado con tGas1, por 48 horas, de las células infectadas (figura 16).

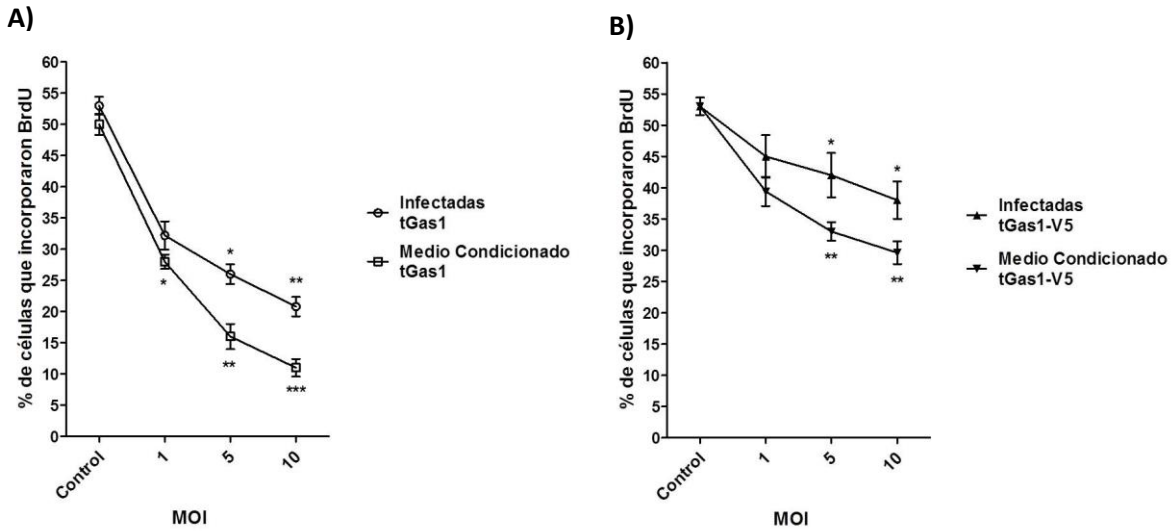


Figura 14. La infección de células C6 con los lentivirus que expresan las formas secretables de Gas1 (tGas1) reduce la proliferación celular. A) Gráfica de proliferación celular, 48 horas posteriores a la infección y con distinto MOI, determinada por la incorporación de BrdU en células C6 infectadas con el lentivirus con *tGas1* y de las células C6 que recibieron el medio condicionado, por 48 horas, de las células infectadas. **B)** Gráfica de proliferación de células C6 infectadas con el lentivirus con *tGas1-V5*, mismas condiciones que las mencionadas arriba. Como control se emplearon células C6 no infectadas o el medio de estas últimas. Los datos representan la media \pm del error estándar. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ con respecto al control, $n = 3$. (Modificado de López-Ornelas, et al., 2011).

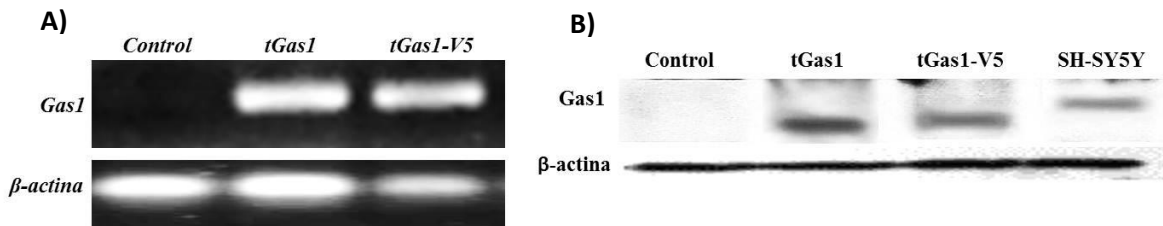


Figura 15. tGas1 y tGas1-V5 se expresaron en las células C6 infectadas. A) RT-PCR de las células control, sin infectar, y de las células infectadas (MOI 10) con los lentivirus con *tGas1* y *tGas1-V5*, donde cada una expresó el transgén infectado. β -actina es el gen de mantenimiento. **C)** Western blot contra Gas1 para comprobar la expresión de la proteína. SH-SY5Y, línea sin suero por 48 horas como control positivo de la expresión. (Modificado de López-Ornelas, et al., 2011).

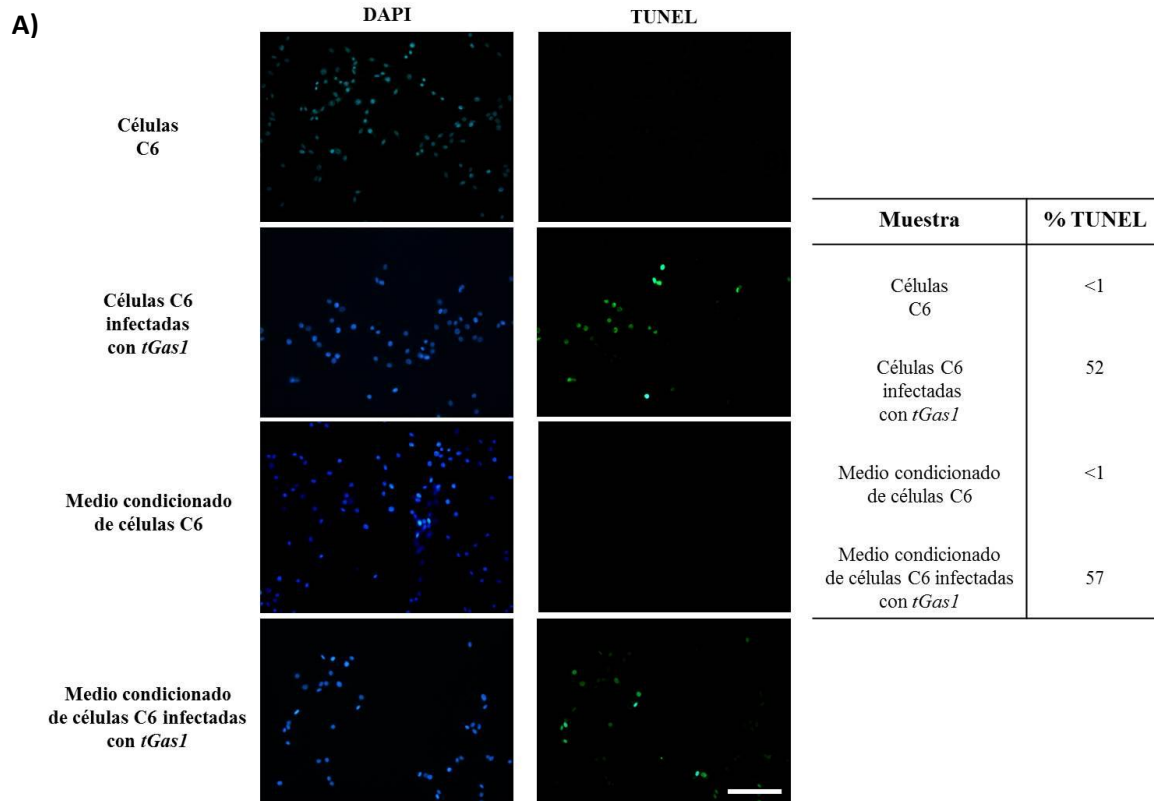


Figura 16. *tGas1* induce apoptosis. A) Células C6 infectadas con el lentivirus con *tGas1*, MOI de 10, y en las cuales se determinó la apoptosis por técnica de TUNEL. El panel superior muestra las células apoptóticas en un cultivo de células C6 a las 48 horas; el segundo panel muestra las células apoptóticas a las 48 horas postinfección con el lentivirus con *tGas1*; el tercer panel muestra un cultivo de células C6 que recibió por 48 horas el medio de las células C6 y el último panel corresponde a un cultivo de células C6 que recibió por 48 horas el medio de las células C6 infectadas con *tGas1*. Las fotografías muestran resultados representativos; los núcleos fueron teñidos con DAPI y la barra de calibración corresponde a 100 μm . **B)** En la tabla se observan los porcentajes de las células positivas a TUNEL de cada una de las condiciones. Datos obtenidos de tres experimentos independientes y de cada uno se contaron 20 campos. (Modificado de López-Ornelas, et al., 2011).

La expresión de *tGas1* es regulable *in vitro*

La primoinfección de células C6 con un lentivirus con el *TR*, MOI de 10, y la posterior infección de estas células con un lentivirus con el gen *tGas1*, MOI de 10, dio como resultado una línea celular estable con los dos transgenes.

La línea celular estable fue tratada con Tetraciclina, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y a las 48 horas se aisló el ARN y proteínas. La expresión de *tGas1* fue evaluada por RT-PCR y se observó que sólo las células que recibieron el tratamiento con Tetraciclina expresaron el transgén *tGas1* (figura 17, A). La presencia de la proteína fue observada mediante western blot e inmunocitoquímica y sólo se observó la expresión de tGas1 en las células que recibieron el tratamiento con Tetraciclina (figura 17, B y C). Como control de la expresión de la proteína se usó la línea celular SH-SY5Y incubada en la ausencia de suero.

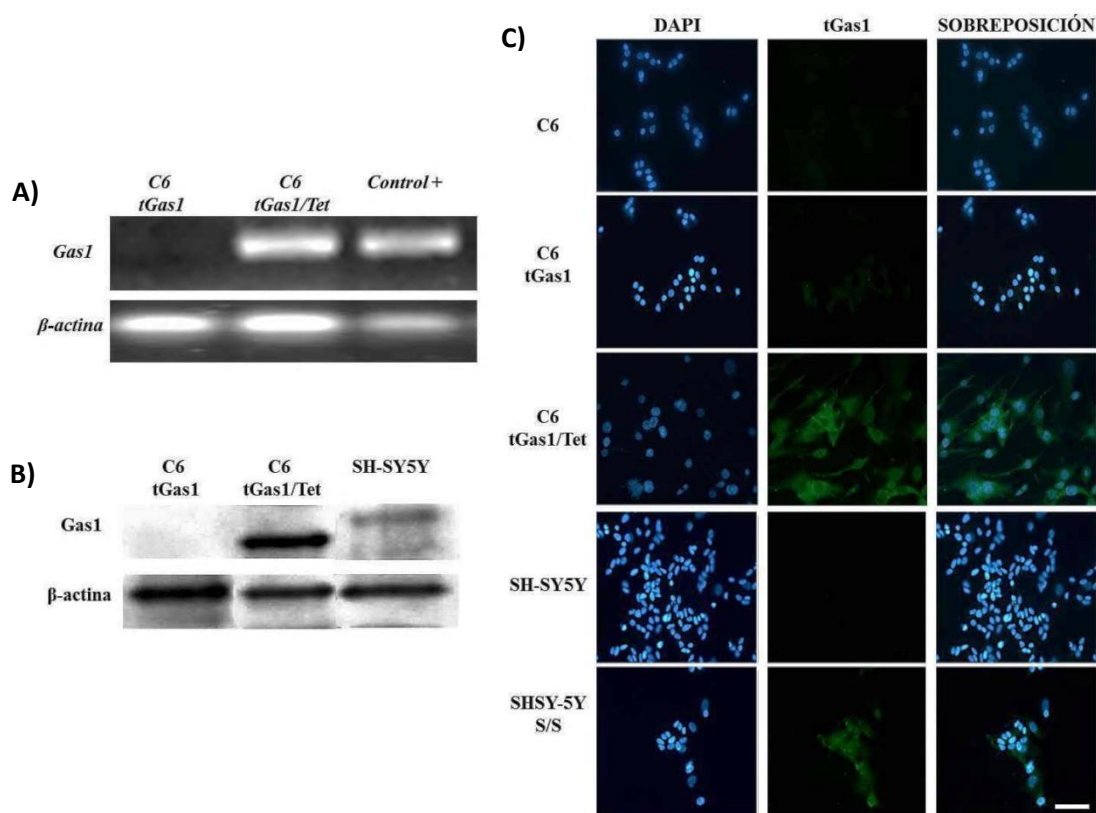


Figura 17. La expresión de tGas1 es regulada por Tetraciclina en una línea C6 estable con el TR y tGas1. A) RT-PCR de la línea C6 estable (con los transgenes de *tGas1* y *TR*), a las 48 horas, sin Tetraciclina (*C6-tGas1*) y con Tetraciclina, 2 $\mu\text{l}/\text{ml}$, (*C6-tGas1/Tet*). Como control positivo (+) de la reacción se amplificó *tGas1* de un plásmido y β -actina es el gen de mantenimiento. B) Expresión de tGas1 en la línea estable, determinada por western blot, en la ausencia o presencia de Tetraciclina bajo las condiciones descritas arriba; la línea SH-SY5Y privada de suero es el control positivo para Gas1 y β -actina es el control de carga. C) Expresión de tGas1 determinada por inmunocitoquímica a las 48 horas; C6 corresponde a la línea celular no infectada; C6-tGas1 corresponde a la línea estable con y sin Tetraciclina (Tet); los dos paneles inferiores corresponden a células SH-SY5Y en la presencia o ausencia de suero (S/S). Los núcleos fueron teñidos con DAPI y las imágenes con sobreposición muestran al núcleo y la expresión de tGas1. Barra de calibración = 100 μm . (Modificado de López-Ornelas, et al., 2011).

Número de copias virales en la línea C6 estable

Por medio de la técnica de southern blot, se determinó el número de copias virales del lentivirus con *tGas1* en la línea C6 estable, esto representa el número de veces que el virus integró su material genómico en el genoma de la célula infectada, el cual fue de 4 (figura 18).



Figura 18. Número de copias virales en la línea C6 estable. Southern blot de la línea celular C6 (1) y de la línea C6 estable (2), donde el ADN genómico fue restringido con la endonucleasa XbaI e hibridado con una ribosonda específica del vector lentiviral de *tGas1*. (Modificado de López-Ornelas, et al., 2011).

El medio de cultivo con *tGas1* inmunodepletado no afecta la viabilidad celular

Para comprobar que el efecto en la viabilidad celular estaba dado por *tGas1*, primero, se realizó un ensayo de inmunoprecipitación de esta proteína del medio de cultivo de: la línea C6 estable, con o sin el tratamiento con Tetraciclina, y de la línea C6 sin infectar. De las condiciones anteriores, *tGas1* sólo fue inmunoprecipitada del medio de la línea C6 estable con Tetraciclina y al compararla con la *tGas1* de un extracto de células que la expresaban, se observó el mismo peso molecular (figura 19, A).

Posteriormente, el medio de cultivo al cual se le inmunoprecipitó *tGas1* fue aplicado como medio condicionado a células C6 en proliferación por 48 horas. Se observó

que el medio inmunoprecipitado, sin tGas1, no tenía efecto en la viabilidad celular, no así, en las células que recibieron el medio condicionado sin inmunoprecipitar tGas1, donde se siguió observando una disminución en la viabilidad celular (figura 19, B).

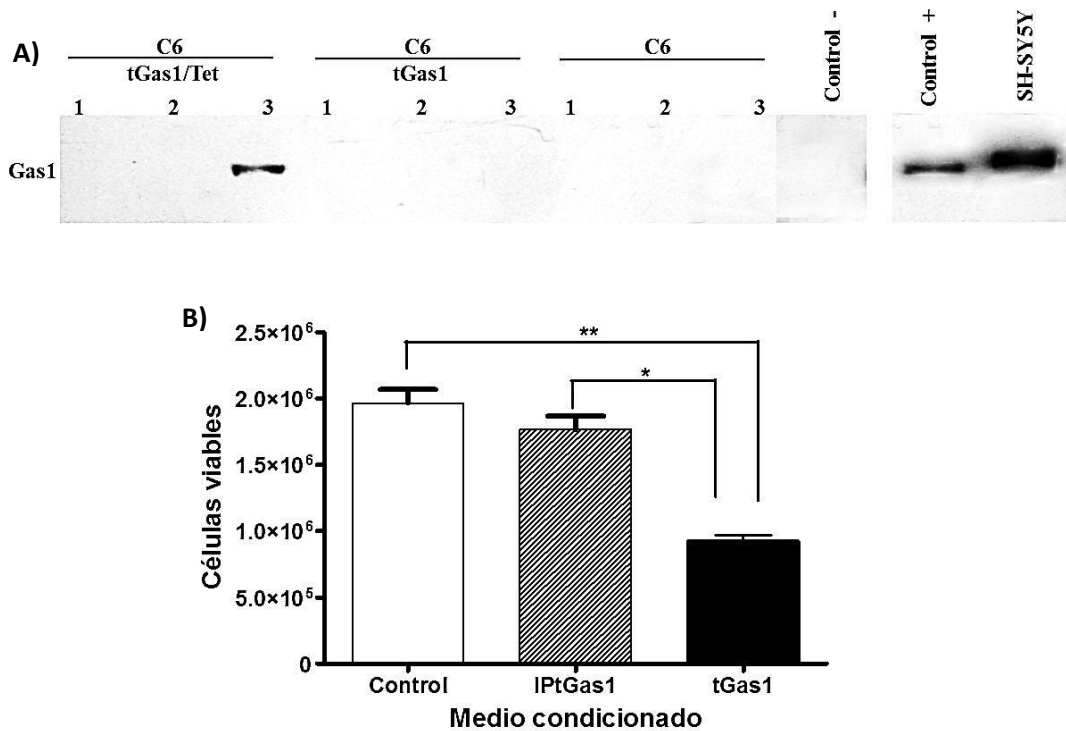


Figura 19. tGas1 está presente en el medio condicionado de la línea C6 estable tratada con Tetraciclina e inhibe la viabilidad celular. A) Inmunoprecipitación de tGas1 del medio de cultivo de 48 horas. Medio de cultivo recolectado de la línea estable con (C6-tGas1/Tet) y sin Tetraciclina (C6-tGas1), como control se empleó el medio de cultivo de la línea C6 sin infectar; las líneas representan distintas condiciones del experimento: (1) medio sin inmunoprecipitar; (2) medio inmunoprecipitado en la ausencia del anticuerpo contra Gas1; y (3) medio inmunoprecipitado en la presencia del anticuerpo de Gas1. El control negativo (-) es el medio inmunoprecipitado de la línea estable con Tetraciclina en la presencia de un anticuerpo policlonal no relacionado (contra la Proteína Ácida Fibrilar Glial, GFAP); como control positivo (+) es el western blot de un extracto celular de la línea C6 estable en la presencia de Tetraciclina por 48 horas; y SH-SY5Y es el extracto de la línea celular sin suero por 48 horas. **B)** Gráfica de la viabilidad celular a las 48 horas en presencia de distintos medios; control, medio de células C6 sin infectar; IPtGas1, medio de la línea C6 estable tratada con Tetraciclina por 48 horas y en donde se inmunoprecipitó tGas1; y tGas1, medio de la línea C6 estable tratada con Tetraciclina por 48 horas sin inmunoprecipitar tGas1. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$, $n = 3$. (Modificado de López-Ornelas, et al., 2011).

Con este resultado, se concluyó que el efecto en la viabilidad en las células C6 que reciben el medio condicionado está dado por la proteína tGas1, debido a que el medio de cultivo al que se le inmunoprecipitó tGas1 no tiene un efecto significativo en la viabilidad celular comparada con el control, pero si tiene una diferencia significativa al momento de compararla con la viabilidad de células que recibieron el medio de cultivo al cual no se le inmunoprecipitó tGas1.

In vivo

La sobreexpresión de *tGas1* en glioblastomas implantados disminuye su crecimiento

Se implantaron 1×10^6 células C6 en el flanco de ratones desnudos (*nu/nu*) y se dividieron en tres grupos: un grupo recibió tratamiento con el lentivirus con *tGas1*, otro grupo tuvo como tratamiento un lentivirus con el gen (inocuo) *LacZ* y el último grupo sólo recibió el vehículo (medio sin suero, grupo control). Los tumores fueron medidos cada tercer día y a los 10 días se extirparon.

Se observó que los tumores que recibieron el tratamiento con el lentivirus con *tGas1* presentaron un volumen menor, aproximadamente en un 80%, en comparación con el grupo control. Por otro lado, se corroboró la expresión del transgén y la proteína por RT-PCR y western blot, respectivamente, de los tumores infectados con el lentivirus con la secuencia de *tGas1* (figuras 20 y 21).



Figura 20. Ejemplo representativo del efecto inhibitor tumoral *in vivo* de tGas1. Fotografía de dos tumores disecados del flanco de ratones desnudos. El tumor de la izquierda recibió el tratamiento con el lentivirus con tGas1 y el tumor de la derecha sólo recibió medio (vehículo).

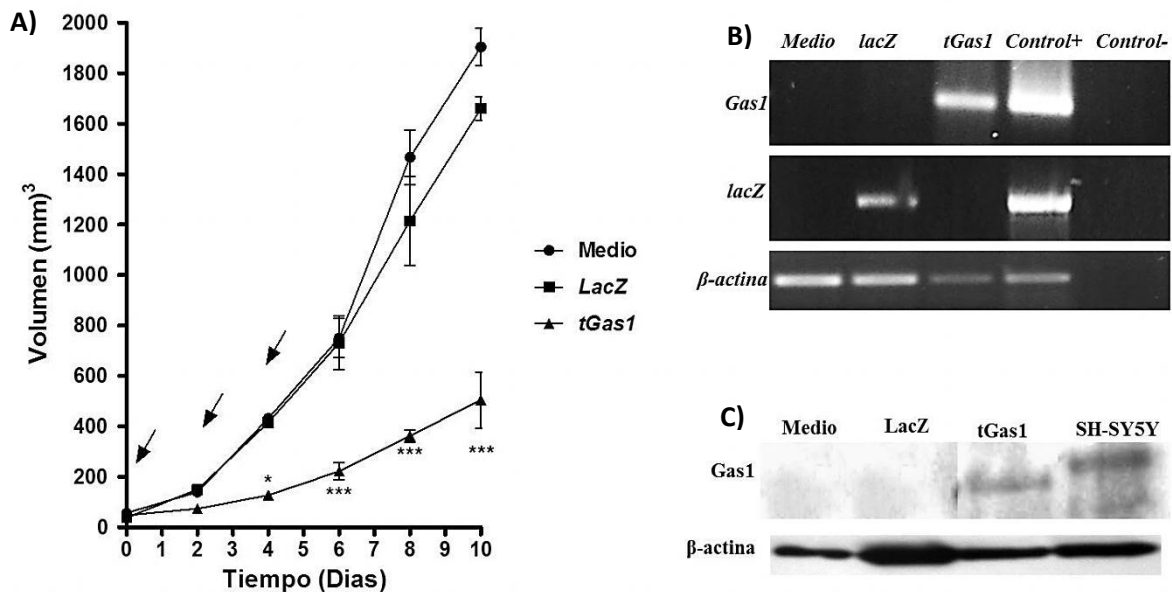


Figura 21. Efecto *in vivo* de tGas1. **A)** Gráfica de crecimiento de los tumores implantados en el flanco de ratones desnudos y tratados con el lentivirus indicado: *Lacz*, expresa el gen inocuo *LacZ*; *tGas1* expresa *tGas1*; y el control sólo recibió medio. Las flechas indican los días de administración del tratamiento. Los datos representan la media \pm del error estándar. * $P<0.05$ y *** $P<0.001$, con respecto al control (medio) y *LacZ*, $n = 5$ por grupo. **B)** RT-PCR de los tumores disecados que recibieron los distintos tratamientos: medio, lentivirus con *LacZ* o lentivirus con *tGas1*; como control positivo (+) se empleó el ADNc del vector respectivo; y el control negativo (-) es la reacción de PCR sin el ADNc. β -actina es el gen de mantenimiento. **C)** Western blot de los tumores con sus distintos tratamientos; SH-SY5Y, son las proteínas de la línea celular sin suero y β -actina es el control de carga. (Modificado de López-Ornelas, et al., 2011).

La expresión de tGas1 en un modelo *in vivo* de glioblastoma es regulable y conserva su efecto antitumoral

Para investigar si la expresión del transgén era regulable *in vivo*, se inoculó en el flanco de ratones desnudos una mezcla de células, en donde el 50% estaba constituido por la línea C6 estable y el otro 50% por células C6. Posteriormente, se dividió a los ratones en 2 grupos: a uno se le administró Tetraciclina, 2mg/kg/día, vía it, cada tercer día, para un total de 3 dosis; y al otro grupo sólo se le administró el vehículo (solución salina). Los tumores fueron medidos cada tercer día y a los 10 días fueron extirpados.

El grupo que recibió Tetraciclina presentó un tamaño menor, aproximadamente 60%, en comparación con el grupo que sólo recibió el vehículo (figura 22).

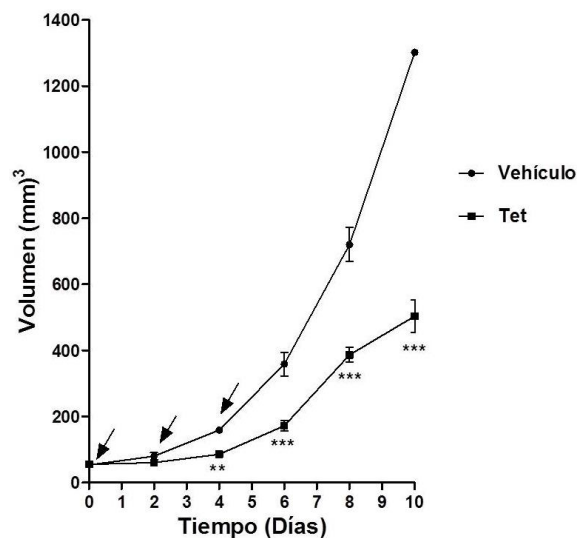


Figura 22. Expresión regulable *in vivo* de tGas1 por Tetraciclina y su efecto antitumoral. Gráfica de crecimiento de los tumores implantados en el flanco de ratones desnudos, una mezcla de 50% de células C6 estables y 50% de células C6, y sus distintos tratamientos, Tetraciclina y vehículo (control). Las flechas indican los días de administración del tratamiento. Los datos representan la media \pm del error estándar. ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ con respecto al control, $n = 5$ por grupo. (Modificado de López-Ornelas, et al., 2011).

Con estos resultados se concluye que la sobreexpresión de tGas1 en un modelo *in vivo* de GBM puede ser regulada y disminuye el crecimiento tumoral.

Uso de CTNs como vehículo de tGas1 hacia glioblastomas

In vitro

Elaboración de una línea estable de células C6 con la Proteína Roja Fluorescente

Debido a que los experimentos *in vivo* con el uso de CTNs se llevaron a cabo por medio de la visualización de fluorescencia, fue necesario obtener una línea tumoral estable con la PRF y una línea estable de CTNs con la GFP, así los tumores en rojo podrían ser distinguidos de las CTNs (verdes) que migren hacia él.

La línea estable de células C6 se obtuvo mediante la transfección del plásmido con Lipofectamina 2000 y la posterior selección de células rojas, a las 48 horas, por citometría de flujo. Posteriormente, las células fueron crecidas en medio de selección (medio de cultivo con Geneticina, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y observadas al microscopio de epifluorescencia (figura 23).

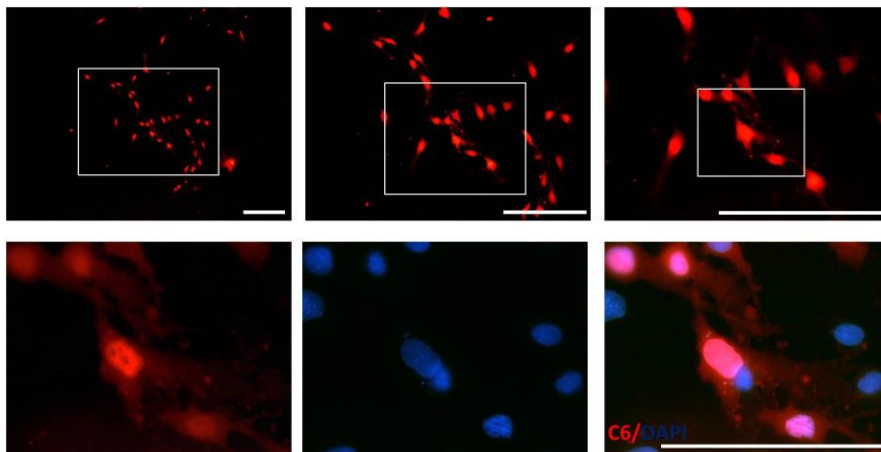


Figura 23. Células C6 estables con la PRF (C6-pDsRed1). Microscopía de epifluorescencia de las células C6 estables con la PRF, seleccionadas por citometría de flujo y antibiótico de selección en el medio, a las 48 horas de cultivo. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Panel superior, los cuadros en blanco muestran el área enfocada para el siguiente aumento, barra de calibración = 100 μm ; panel inferior, barra de calibración = 50 μm .

Obtención de una línea estable de células ReNcell (CTNs) que expresan la Proteína Verde Fluorescente

Para observar la migración de las CTNs hacia el glioblastoma, se decidió monitorearlas mediante la fluorescencia de la GFP. La expresión se logró mediante la infección de un retrovirus con la secuencia de la *gfp*.

La infección de las ReNcell se llevó a cabo con un MOI de 40, el medio de cultivo fue cambiado a las 24 horas y a las 72 horas postinfección las células fueron seleccionadas por citometría de flujo. Por último se observó a las células mediante microscopía de epifluorescencia (figura 24, A).

Obtención de una línea estable de células ReNcell de expresión regulable que expresan la GFP, un elemento represor de la expresión (TR) y tGas1

Para este apartado se emplearon lentivirus de nueva generación con dos ventajas en comparación con los anteriores: se obtienen en mayores títulos virales y la expresión proteica es mayor.

Las células ReNcell con la expresión estable de la GFP (ReNcell-GFP) fueron infectadas con un lentivirus que codifica la expresión de un TR regulado por Tetraciclina (MOI de 40), posteriormente dichas células fueron seleccionadas durante 2 semanas con Geneticina (100 µg/ml) en el medio de cultivo. Después, esta línea celular fue infectada con un lentivirus con la secuencia de *tGas1* (MOI de 40) y seleccionada durante 2 semanas con Blastidina (5 µg/ml) y Geneticina (100 µg/ml) (figura 24, B y C).

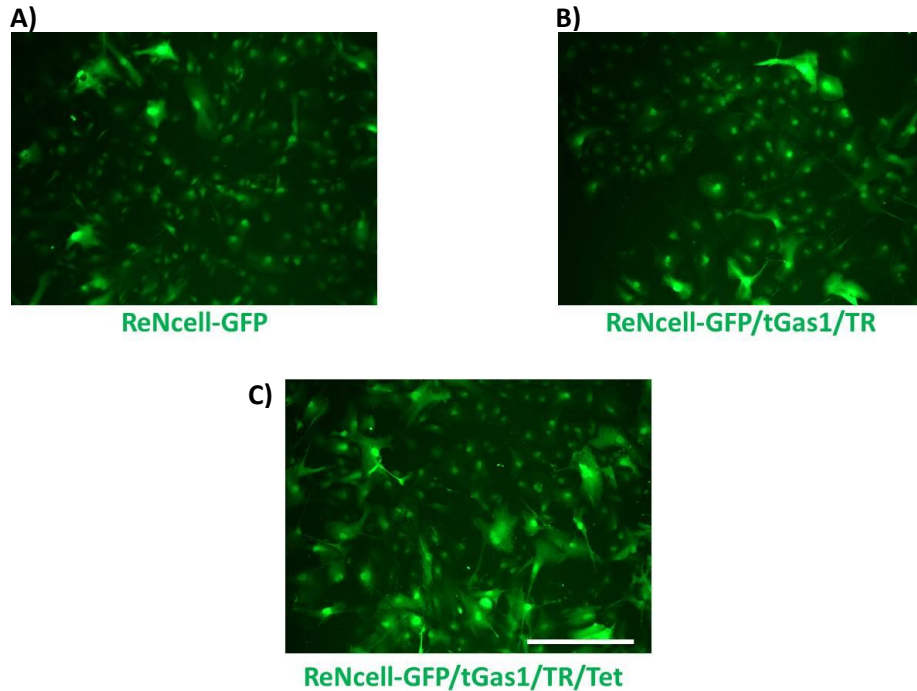


Figura 24. Líneas de CTNs estables con la GFP. Imágenes por microscopía de fluorescencia de las distintas líneas estables de CTNs. **A)** Línea celular estable de CTNs con la GFP (ReNcell-GFP) a las 72 horas de cultivo. **B)** Línea celular estable con la GFP, tGas1 y el TR (ReNcell-GFP/tGas1/TR) a las 72 horas de cultivo. **C)** Línea celular estable con la GFP, tGas1 y el TR a las 72 horas de tratamiento con Tetraciclina (ReNcell-GFP/tGas1/TR/Tet). Barra de calibración = 100 μ m.

La línea estable de CTNs, ReNcell-GFP/tGas1/TR, expresa *tGas1* de una manera regulable mediada por Tetraciclina

Por la técnica de RT-PCR y western blot, se demostró que la línea celular estable, ReNcell-GFP/tGas1/TR, expresa tGas1 en respuesta a la administración de Tetraciclina (2 μ g/ml) en el medio de cultivo, dicha expresión se observó desde las 24 horas de tratamiento con Tetraciclina y fue aumentando conforme transcurrió el tiempo (hasta las 72 horas) (figura 25).

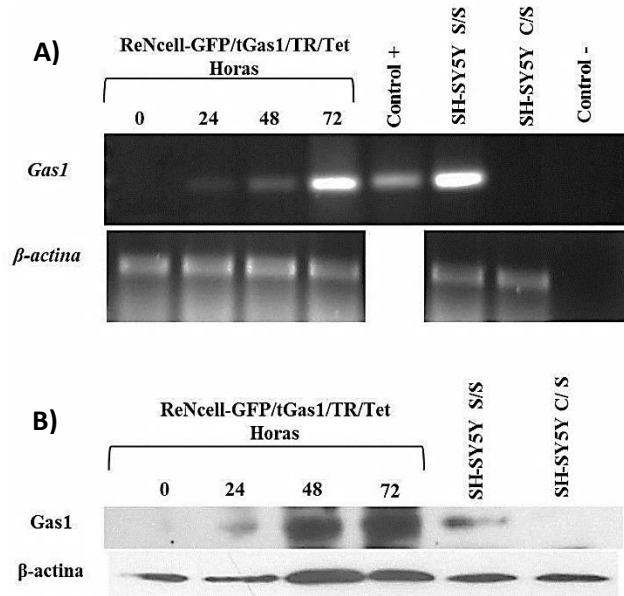


Figura 25. La expresión de tGas1 en la línea estable ReNcell-GFP/tGas1/TR es regulable con Tetraciclina. A) RT-PCR de la línea estable ReNcell-GFP/tGas1/TR/Tet a las 0, 24, 48 y 72 horas de tratamiento con Tetraciclina. Control positivo (+), es la reacción de PCR con un plásmido con *Gas1*; SH-SY5Y es la línea celular en la ausencia (S/S) o en la presencia (C/S) de suero; Control negativo (-) es la reacción de PCR sin el ADNc. β -actina es el gen de mantenimiento. **B)** Western blot de la línea estable de CTNs en las condiciones mencionadas anteriormente; SH-SY5Y es el extracto de proteínas de la línea celular sin (S/S) o con (C/S) suero, control positivo de expresión, y la β -actina es el control de carga.

Empleando las mismas técnicas, se demostró que tGas1 sólo se expresa en presencia de Tetraciclina y no así en las ReNcell-GFP ni en las ReNcell-GFP/tGas1/TR (línea celular estable sin tratamiento con Tetraciclina) (figura 26). Este último punto es importante debido a que muchos sistemas regulables presentan una expresión basal en la ausencia de Tetraciclina y dicha expresión no fue observada en nuestro sistema. También es de destacar que las CTNs no expresaron tGas1.

Con estos resultados se concluye que las CTNs con la GFP no expresan *tGas1* y que la línea celular estable con el TR y tGas1 sólo expresa el transgén en presencia de Tetraciclina.

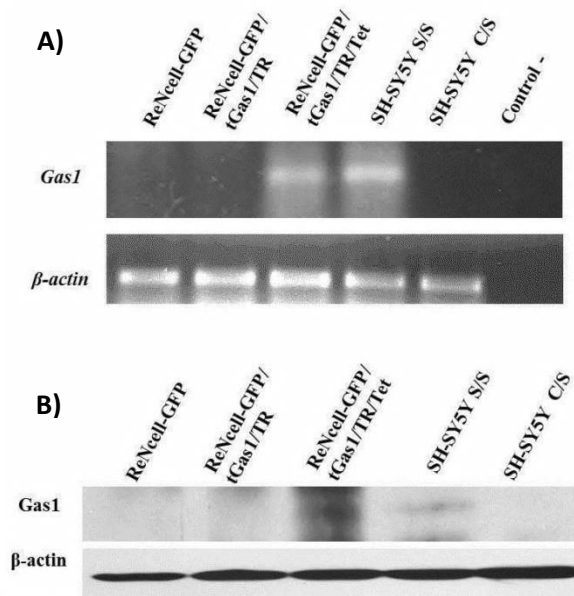


Figura 26. tGas1 sólo se expresa en la línea estable ReNcell-GFP/tGas1/TR en la presencia de Tetraciclina. A) RT-PCR de las dos líneas estables de CTNs a las 72 horas de cultivo: la línea ReNcell-GFP; y la línea ReNcell-GFP/tGas1/TR en la ausencia o presencia de Tetraciclina (Tet) por 72 horas; SH-SY5Y es la línea celular en la ausencia (S/S) o presencia (C/S) de suero; Control negativo (-) es la reacción de PCR sin el ADNc. *β-actina* es el gen de mantenimiento. **B)** Western blot de las líneas estables y condiciones mencionadas anteriormente; SH-SY5Y es el extracto de proteínas de la línea celular sin (S/S) o con(C/S) suero. *β-actina* es el control de carga.

tGas1 producida por las CTNs disminuye la viabilidad celular de ellas mismas y de células de glioblastoma

Con la técnica de azul de tripano, se observó que la expresión de tGas1 provocó una disminución en la viabilidad celular de la línea estable ReNcell-GFP/tGas1/TR a las 72 horas de tratamiento con Tetraciclina, dicha disminución fue de un 30% con respecto al control, la línea estable ReNcell-GFP. Por otro lado, no se ve efecto alguno en la línea ReNcell-GFP que recibe Tetraciclina o en la línea ReNcell-GFP/tGas1/TR sin Tetraciclina (figura 27, A).

Posteriormente, se tomó el medio de cultivo de 72 horas de las 2 líneas estables, con y sin Tetraciclina, y se aplicó a células C6-pDsRed1 en proliferación, se observó que el

medio de las CTNs que produjeron tGas1 disminuyó la viabilidad de las células C6-pDsRed1 a las 48 y 72 horas de tratamiento. La disminución es mayor a las 72 horas (47% menos células viables con respecto al control) (figura 27, B).

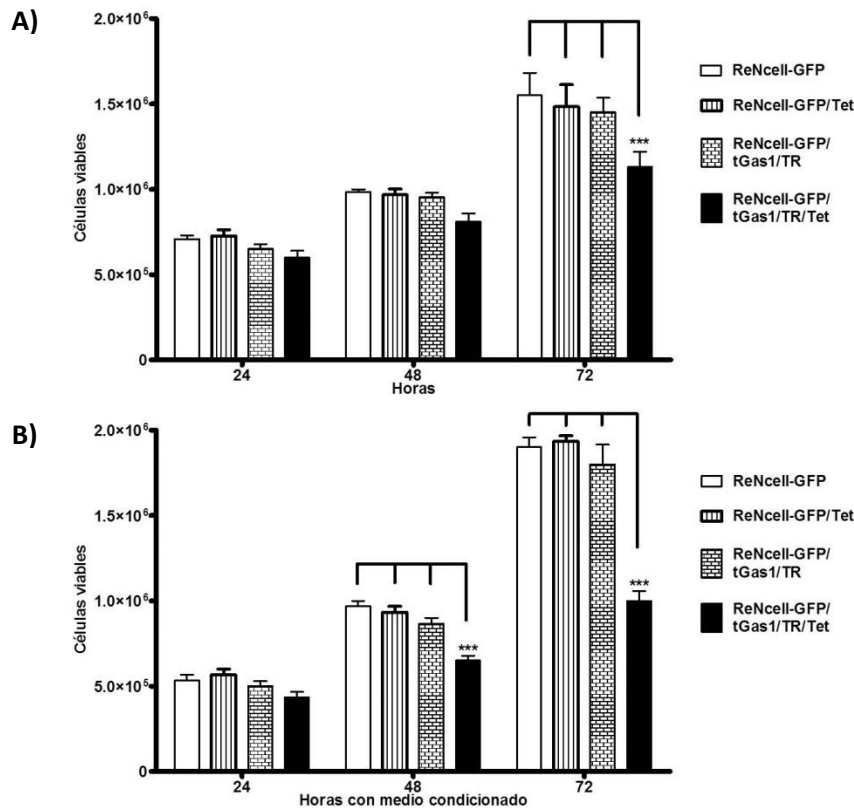


Figura 27. tGas1 producida por las CTNs disminuye la viabilidad celular de estas mismas y de células C6 en cultivos independientes. **A)** Gráfica de viabilidad celular, a las 24, 48 y 72 horas de cultivo, de las dos líneas estables de CTNs: ReNcell-GFP y ReNcell-GFP/tGas1/TR, en la ausencia o presencia de Tetraciclina (Tet). **B)** Gráfica de la viabilidad de las células C6-pDsRed1, a las 24, 48 y 72 horas, que reciben el medio condicionado de las CTNs de 72 horas de cultivo en las condiciones descritas previamente. Los datos representan la media \pm del error estándar. *** $P < 0.001$, $n = 3$.

Con este resultado se concluye que tGas1 disminuye la viabilidad celular de las CTNs que la secretan, tal como se había observado cuando tGas1 era producido por las células C6, pero que también disminuye la viabilidad celular de las células C6 que la reciben.

tGas1 disminuye la proliferación celular de las CTNs y de las células de glioblastoma

Debido a que el efecto en la viabilidad celular en las CTNs había sido mayor a las 72 horas de tratamiento con Tetraciclina, se hizo un ensayo de incorporación de BrdU en estas células y se observó una disminución en la proliferación celular, debido a tGas1, de un 56% con respecto al control (figura 28, A).

Posteriormente, se realizó el mismo ensayo a las células C6-pDsRed1 que recibieron el medio de las CTNs que produjeron tGas1 por 72 horas. El tratamiento duró 72 horas debido a que fue el lapso de tiempo donde se observó el mayor efecto en la viabilidad celular. El medio condicionado que contenía tGas1 disminuyó la proliferación celular de las C6-pDsRed1 en un 53% con respecto al control (figura 28, B).

tGas1 induce apoptosis tanto en las CTNs como en las células de glioblastoma

Por medio de la técnica de TUNEL, se valoró si tGas1 inducía apoptosis en la línea productora de la proteína (CTNs), así como también en la línea celular que la recibía (C6). A las 72 horas de expresar tGas1, debido a la administración de Tetraciclina, la línea productora presentó el mayor porcentaje de células apoptóticas, 29% con respecto al control, (figura 29, A). Al momento de realizar el ensayo a las células C6-pDsRed1 que reciben el medio condicionado por 72 horas, se observó que las que recibieron el medio condicionado con tGas1 presentaron el mayor porcentaje de células apoptóticas, 43% con respecto al control, (figura 29, B).

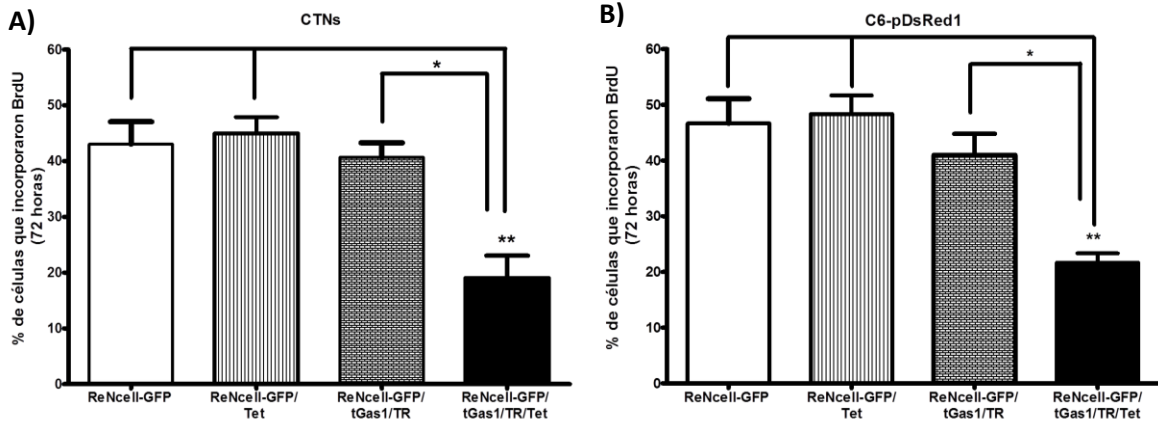


Figura 28. tGas1 disminuye la proliferación celular de manera autocrina y paracrina. A) Gráfica de incorporación de BrdU en las dos líneas estables de CTNs a las 72 horas de cultivo: ReNcell-GFP y ReNcell-GFP/tGas1/TR, en la ausencia o presencia de Tetraciclina (Tet) en el medio. **B)** Gráfica de incorporación de BrdU en las células C6-pDsRed1 que reciben el medio de cultivo, por 72 horas, de las condiciones citadas en el inciso anterior. Los datos representan la media \pm del error estándar. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$, $n = 3$.

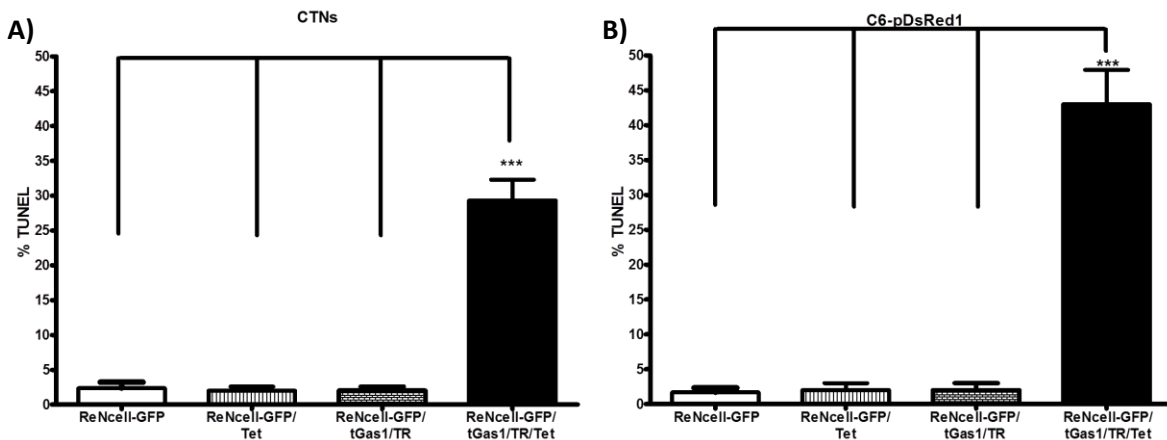


Figura 29. tGas1 induce apoptosis de una manera autocrina y paracrina. A) Gráfica del porcentaje del número de células positivas a TUNEL, a las 72 horas, de las 2 líneas estables de CTNs: líneas ReNcell-GFP y ReNcell-GFP/tGas1/TR en la ausencia o presencia de Tetraciclina (Tet) en el medio. **B)** Gráfica del porcentaje del número de células positivas a TUNEL de células C6-pDsRed1 que reciben el medio de cultivo, por 72 horas, de cada una de las condiciones mencionadas en el inciso anterior. Los datos representan la media \pm del error estándar. *** $P < 0.001$, $n = 3$.

Con estos resultados se concluye que la tGas1 producida por las CTNs tiene efectos autocrinos (CTNs) y paracrinos (C6). Tales efectos son sobre: la viabilidad celular, la proliferación celular y la apoptosis.

In vivo

Migración desde el hemisferio cerebral contralateral de las CTNs hacia un glioblastoma implantado

Para valorar si las CTNs podían migrar y transportar a la proteína tGas1 hacia un tumor implantado intracranealmente y que ésta tuviera un efecto antitumoral, se inocularon en un hemisferio cerebral de ratones desnudos 1×10^6 células C6-pDsRed1 y a la semana se dividió a los ratones en 4 grupos: al primero sólo se le administraría Tetraciclina a los 14 días de implantación de las células C6-pDsRed1; al segundo, se le inocularon en el hemisferio cerebral contralateral 5×10^5 células ReNcell-GFP; al tercero y al cuarto se les inoculó 5×10^5 células ReNcell-GFP/tGas1/TR.

Se permitió que las CTNs migraran por una semana para posteriormente administrar Tetraciclina vía ip (50 mg/kg/día, por 7 días) al primer, segundo y cuarto grupo. El tercer grupo sólo recibió el vehículo de la Tetraciclina, solución salina. Veintiún días después de la implantación de las células C6-pDsRed1, los ratones fueron sacrificados y los cerebros perfundidos y fijados. Los cerebros fueron cortados y observados al microscopio de epifluorescencia, donde fue posible identificar a las células ReNcell en verde y a las células tumorales en rojo.

En los cerebros de los ratones a los que sólo se les inocularon las células C6-pDsRed1 y se administró Tetraciclina, sólo se apreció un gran crecimiento tumoral intracraneal (figura 30).

Al momento de observar los cerebros a los cuales se les inoculó las células C6-pDsRed1 y las ReNcell-GFP y se les administró Tetraciclina, se observó en la región del tumor la presencia de las CTNs que migraron desde el hemisferio cerebral contralateral (figura 31).

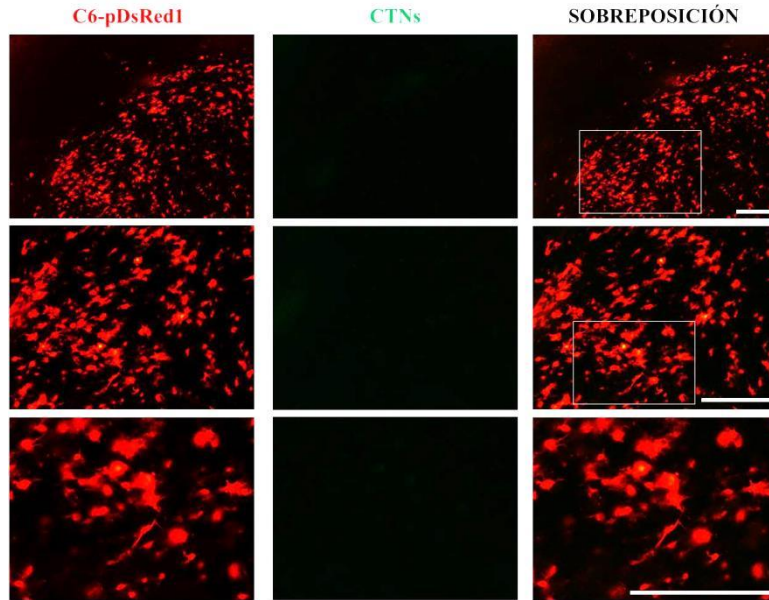


Figura 30. Las células C6-pDsRed1 forman un tumor intracerebral. Fotografía representativa por microscopía de epifluorescencia del tumor intracerebral, donde sólo se inocularon células C6-pDsRed1 y se administró Tetraciclina. Se delimita perfectamente la región tumoral (rojo) del tejido cerebral sano. Los cuadros en blanco muestran el área enfocada para el siguiente aumento (panel inferior). Barra de calibración = 100 μm .

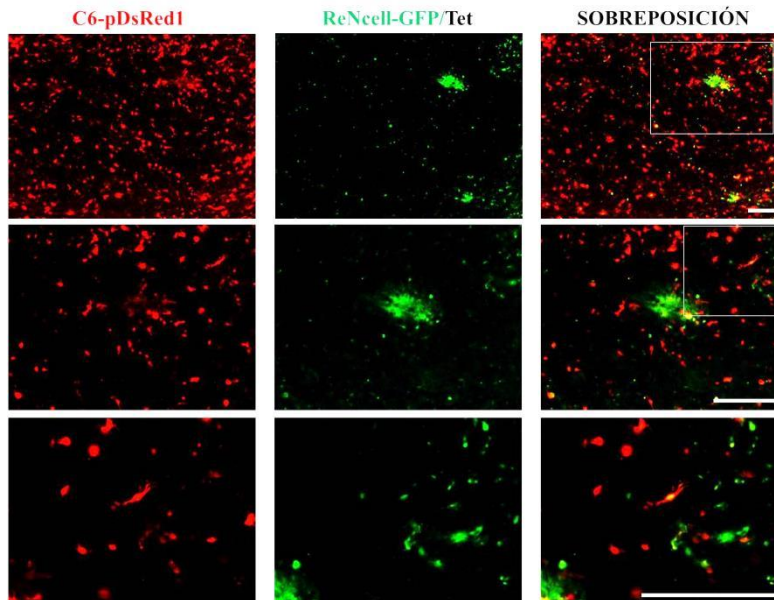


Figura 31. Las células ReNcell-GFP migran hacia un tumor desarrollado por el xenoinplante de células C6. Fotografía representativa por microscopía de epifluorescencia de la región tumoral intracerebral donde se inocularon células C6-pDsRed1 y células ReNcell-GFP en el hemisferio cerebral contralateral con la subsecuente administración de Tetraciclina. Los cuadros en blanco muestran el área enfocada para el siguiente aumento (panel inferior). Barra de calibración = 100 μm .

En los cerebros a los cuales se les inoculó las células C6-pDsRed1 y las ReNcell-GFP/tGas1/TR y no se les administró Tetraciclina, se observó en la región tumoral la presencia de las CTNs que también migraron desde hemisferio cerebral contralateral (figura 32).

Por último, al momento de ver al microscopio los cortes de los cerebros a los cuales se les inocularon las células C6-pDsRed1 y las ReNcell-GFP/tGas1/TR y que habían sido tratados con Tetraciclina, se observó que las CTNs también habían migrado a la región tumoral desde el hemisferio cerebral contralateral (figura 33). Interesantemente, al momento de ver el corte coronal del cerebro completo, se pudo observar la migración desde el sitio de inoculación de las ReNcell-GFP/tGas1/TR hacia el hemisferio cerebral donde se localizaba el tumor, por otro lado, también se observó que algunas ReNcell-GFP/tGas1/TR se quedaron en el sitio de la lesión generada por la inoculación de las mismas (figura 34).

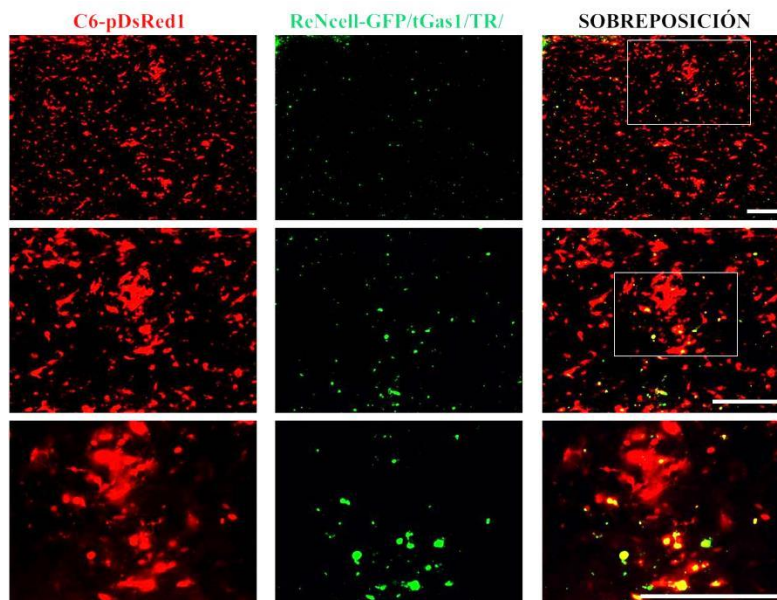


Figura 32. Las células ReNcell-GFP/tGas1/TR migran hacia un tumor desarrollado por el xenoinplante de células C6. Fotografía representativa por microscopía de epifluorescencia de la región tumoral intracerebral donde se inocularon células C6-pDsRed1 y ReNcell-GFP/tGas1/TR en el hemisferio cerebral contralateral sin la administración de Tetraciclina. Los cuadros en blanco muestran el área enfocada para el siguiente aumento (panel inferior). Barra de calibración = 100 μm .

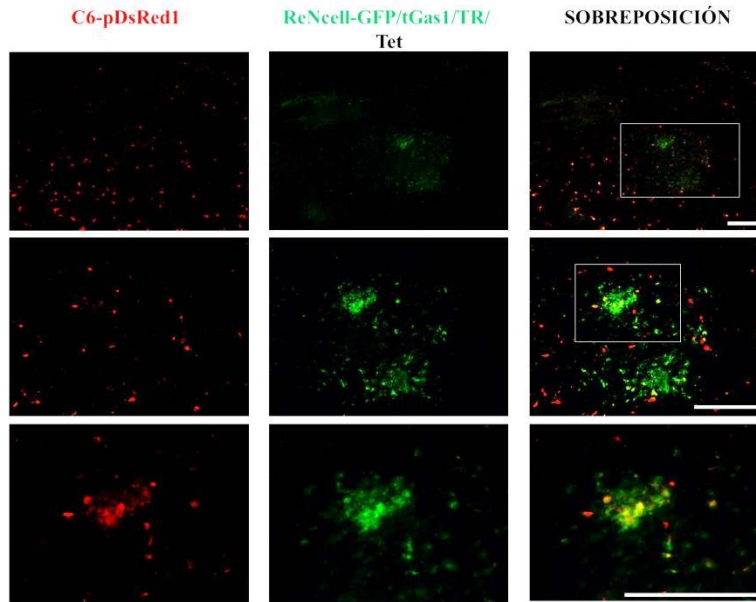


Figura 33. Las células ReNcell-GFP/tGas1/TR que expresan tGas1 migran hacia un tumor desarrollado por el xenoinplante de células C6. Fotografía representativa por microscopía de epifluorescencia de la región tumoral intracerebral donde se inocularon células C6-pDsRed1 y ReNcell-GFP/tGas1/TR en el hemisferio cerebral contralateral con la subsecuente administración de Tetraciclina. Los cuadros en blanco muestran el área enfocada para el siguiente aumento (panel inferior). Barra de calibración = 100 μ m.

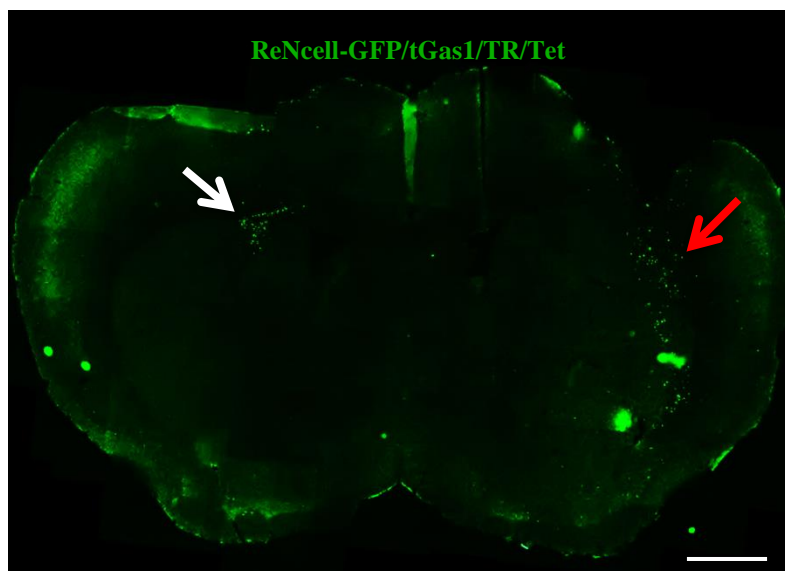


Figura 34. Migración preferencial de las CTNs hacia un GBM. Fotografía por epifluorescencia de un corte coronal cerebral completo donde se inocularon células C6-pDsRed1 y ReNcell-GFP/tGas1/TR en el hemisferio cerebral contralateral con la subsecuente administración de Tetraciclina. Flecha en blanco, sitio de inoculación de las ReNcell-GFP/tGas1/TR; Flecha en rojo, sitio de inoculación de las C6-pDsRed1. Barra de calibración = 1 mm.

Con estos resultados se concluye que las dos líneas celulares estables de CTNs, la línea ReNcell-GFP y la línea ReNcell-GFP/tGas1/TR, migran hacia un GBM intracerebral implantado cuando son inoculadas en el hemisferio cerebral contralateral. Importantemente, al observar el corte cerebral completo (figura 34), se corroboró que la expresión de tGas1 con Tetraciclina se indujo cuando las CTNs ya habían migrado hacia el tumor, por lo que se esperaba que hubiese un efecto terapéutico.

***tGas1* puede ser transportado por las CTNs hacia un glioblastoma implantado y conservar su efecto inhibidor tumoral**

Para evaluar el volumen tumoral posterior al tratamiento de los distintos grupos, los cortes coronales de los cerebros fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina, observados al microscopio de campo claro y el volumen tumoral fue determinado (figura 35, A-D). Se observó que los tumores que habían sido tratados con la línea celular estable de CTNs ReNcell-GFP/tGas1/TR y que expresaron tGas1 por la administración de Tetraciclina, presentaron un volumen menor en comparación con los grupos control, 77% de reducción. Por otro lado, no se observó un efecto antitumoral por parte de las CTNs ReNcell-GFP ni por parte de las ReNcell-GFP/tGas1/TR que no liberaron tGas1, tampoco la Tetraciclina tuvo un efecto antitumoral (figura 35, E).

Posteriormente, dos tumores de cada grupo fueron extirpados y se aisló el ARN y proteínas para corroborar la expresión del transgén y de la proteína tGas1. *tGas1* sólo se amplificó en los tumores que recibieron la línea estable ReNcell-GFP/tGas1/TR y que recibieron Tetraciclina. La presencia de la proteína también sólo fue visualizada en los mismos tumores (figura 36).

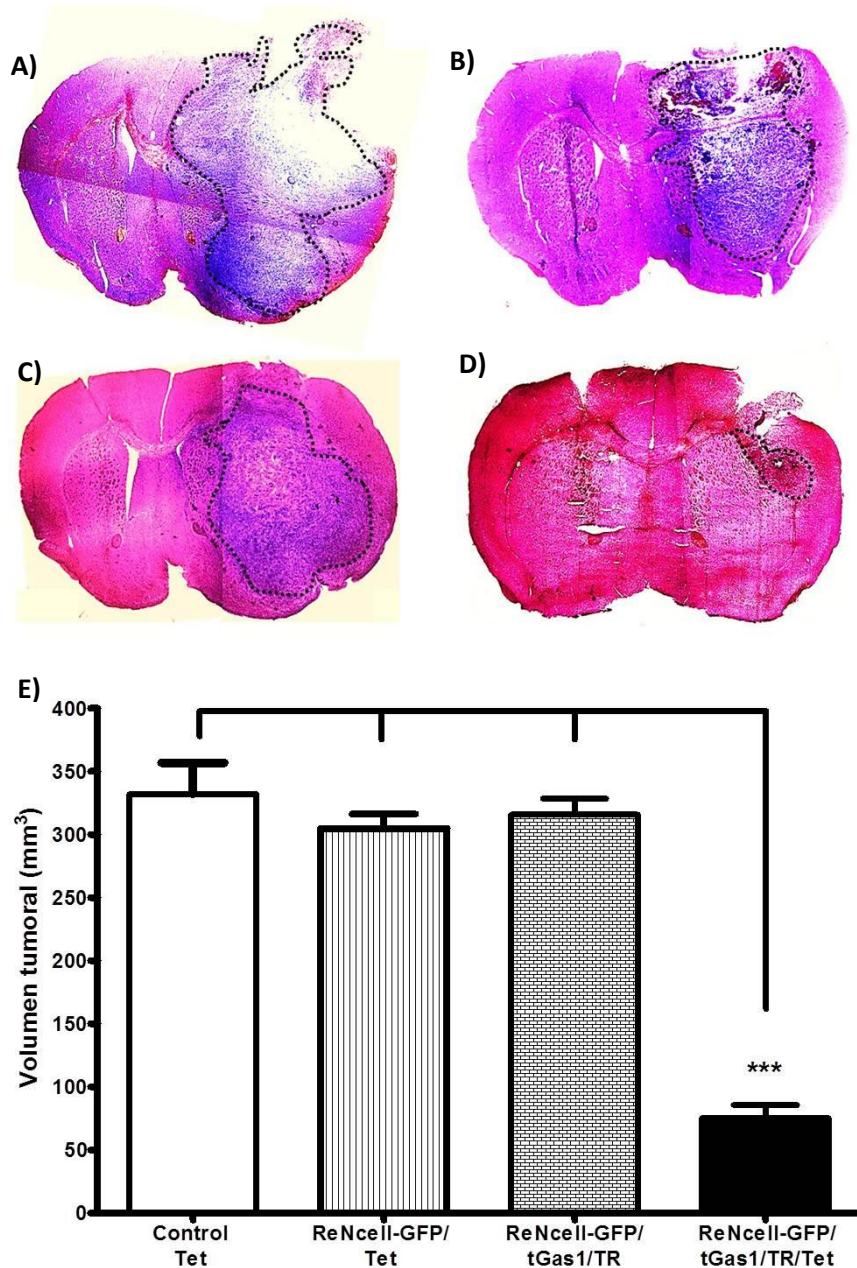


Figura 35. *tGas1* transportado por las CTNs conserva su efecto antitumoral en un modelo *in vivo* e intracerebral de GBM. Las imágenes superiores corresponden a las fotografías representativas de los cortes coronales de los cerebros teñidos con Hematoxilina y Eosina a los 21 días de inoculado el tumor y con los distintos tratamientos. Los tumores se encuentran delineados por la línea punteada. **A)** Ratones que recibieron Tetraciclina; **B)** Ratones que recibieron la línea celular estable ReNcell-GFP y Tetraciclina; **C)** Ratones que recibieron la línea celular estable ReNcell-GFP/*tGas1*/TR sin Tetraciclina y; **D)** Ratones que recibieron la línea celular estable ReNcell-GFP/*tGas1*/TR y Tetraciclina. **E)** Gráfica de los volúmenes tumorales a los 21 días de inoculado el tumor y con los tratamientos mencionados anteriormente. Los datos representan la media \pm del error estándar. *** $P < 0.001$, $n = 5$ por grupo.

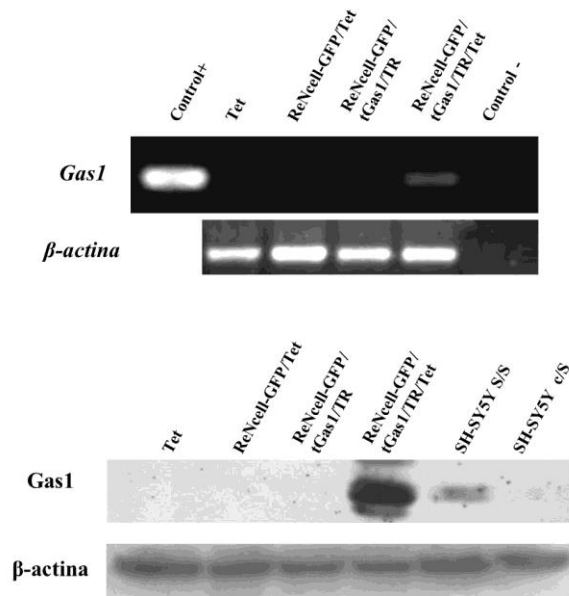


Figura 36. *tGas1* sólo se detectó en los tumores tratados con la línea ReNcell-GFP/*tGas1*/TR y que recibió Tetraciclina. A) RT-PCR de los tumores extraídos a los 21 días de inoculación de las células C6-pDsRed1 y con los distintos tratamientos. Tet, ratones tratados con Tetraciclina; ReNcell-GFP/Tet, ratones tratados con la línea estable y Tetraciclina; ReNcell-GFP/*tGas1*/TR, ratones tratados sólo con la línea estable y; ReNcell-GFP/*tGas1*/TR/Tet, ratones tratados con la línea estable y Tetraciclina. Control positivo (+), producto de un plásmido con la secuencia de *Gas1*. Control negativo (-), reacción de PCR sin el ADNc. **B)** Western blot confirmatorio de la expresión de *tGas1* en las condiciones mencionadas anteriormente. SH-SY5Y, línea celular en la ausencia (S/S) o presencia (C/S) de suero.

***tGas1* disminuye el estado caquéctico en ratones con glioblastoma**

Para evaluar el efecto de los distintos tratamientos en el estado general de los ratones con GBM, se pesó a cada grupo de ratones el primer día de inoculación de las células C6-pDsRed1 y el último día de tratamiento en cualquiera de sus modalidades, periodo de 3 semanas. Al momento de comparar la ganancia en el peso corporal en los distintos grupos de ratones, se observó que los ratones tratados con la línea estable ReNcell-GFP/*tGas1*/TR y que expresaron *tGas1*, debido a la administración de Tetraciclina, presentaron una tasa de aumento de peso mayor a la de los otros tres grupos. Así, tenemos que los ratones tratados con *tGas1* ganaron en promedio 1.4 g más que los ratones que sólo recibieron Tetraciclina (grupo control) (figura 37).

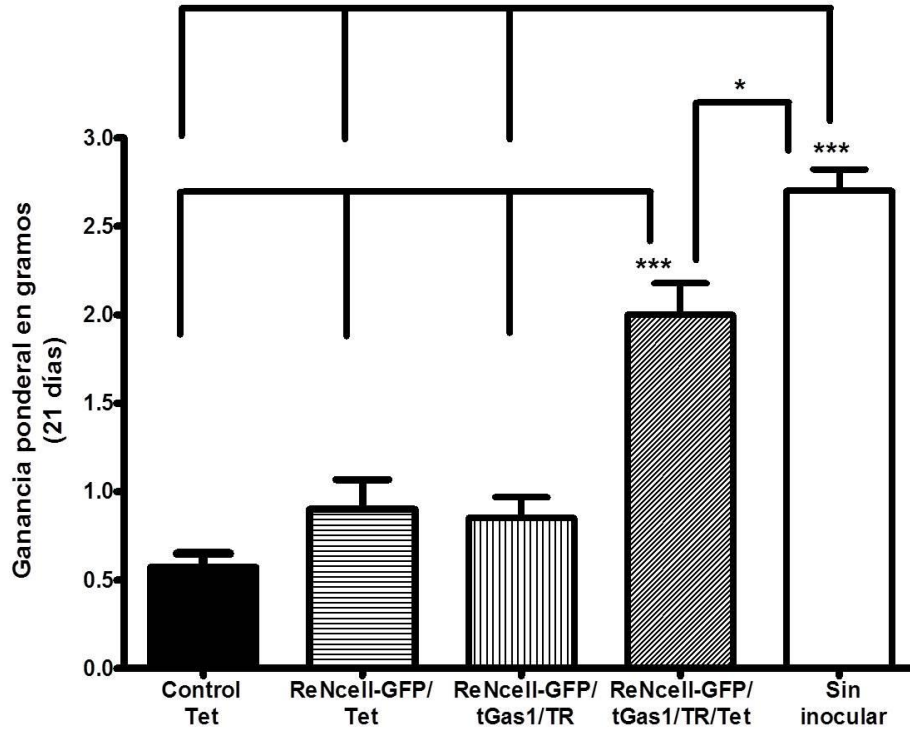


Figura 37. tGas1 incrementa la ganancia ponderal en ratones desnudos con GBM. Gráfica de la ganancia ponderal de los distintos grupos de ratones y sus tratamientos, el lapso de tiempo comprende desde el día de inoculación de las células C6-pDsRed1 hasta el último día de tratamiento. Control-Tet, ratones tratados sólo con Tetraciclina; ReNcell-GFP/Tet, ratones tratados con la línea celular estable y Tetraciclina; ReNcell-GFP/tGas1/TR, ratones tratados con la línea celular estable sin Tetraciclina; ReNcell-GFP/tGas1/TR/Tet, ratones tratados con la línea celular estable y Tetraciclina; Sin inocular, ratones a los que no se les implantó células C6-pDsRed1 ni CTNs. Los datos representan la media \pm del error estándar. * $P < 0.05$ y *** $P < 0.001$, $n = 7$ por grupo.

Este último dato es importante debido a que en todo proceso tumoral existe un estado de caquexia y tGas1 mejoró el estado global de los ratones.

tGas1 mejora la supervivencia en ratones con glioblastoma

Para seguir evaluando el efecto de tGas1 sobre el estado general de ratones desnudos con GBM, se realizó una curva de supervivencia Kaplan-Meier. Basándose en los resultados previamente obtenidos, esta vez sólo se emplearon tres grupos: al primer grupo sólo se le inoculó células C6-pDsRed1 y se le administró Tetraciclina; al segundo

grupo se le inoculó células C6-pDsRed1 y las CTNs ReNcell-GFP/tGas1/TR sin Tetraciclina y; al tercer grupo se le inoculó células C6-pDsRed1 y las CTNs ReNcell-GFP/tGas1/TR con Tetraciclina. Se siguió el mismo esquema de implantación y tratamiento al empleado anteriormente para la migración de las CTNs, sólo que en esta ocasión los ratones no fueron sacrificados. Por último, los días en que iban muriendo los ratones fueron censados y graficados.

A la muerte de todos los ratones, la gráfica proyectó una mayor supervivencia en el grupo de ratones tratados con las células ReNcell-GFP/tGas1/TR y que expresaron tGas1, supervivencia media de 42 días en comparación con la supervivencia media del grupo control (tratado sólo con Tetraciclina) que fue de 24 días (figura 38). La supervivencia en el grupo tratado con tGas1 aumentó un 75% con respecto al control. Por otro lado, no se vio un efecto en la supervivencia en los ratones tratados con las ReNcell-GFP/tGas1/TR que no expresaron tGas1 (supervivencia media de 26 días).

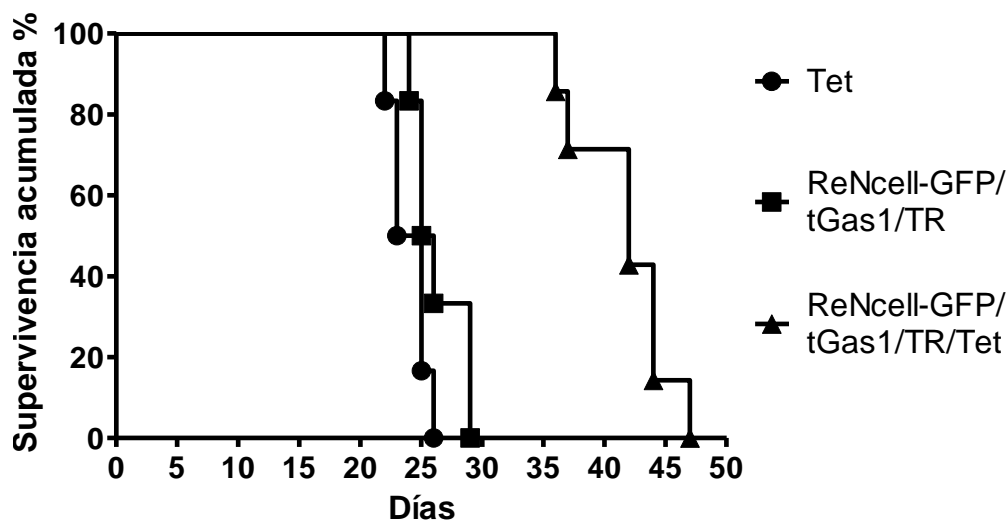


Figura 38. tGas1 aumenta la supervivencia de ratones desnudos con GBM. Curva de supervivencia Kaplan-Meier de los distintos grupos y sus tratamientos. Tet, ratones a los que se les inoculó células C6-pDsRed1 y sólo recibieron Tetraciclina ($n = 6$); ReNcell-GFP/tGas1/TR, ratones a los que se les inoculó células C6-pDsRed1 y la línea estable de CTNs ($n = 6$) y; ReNcell-GFP/tGas1/TR/Tet, ratones a los que se les inocularon células C6-pDsRed1 y la línea estable de CTNs con la subsecuente administración de Tetraciclina ($n = 7$). Prueba Log-rank (Mantel-Cox), $P = 0.0023$.

Con estos resultados se concluye que las CTNs que expresan tGas1 en un GMB implantado mejoran la supervivencia de los ratones. Interesantemente, ni la Tetraciclina ni las CTNs tienen un efecto sobre la supervivencia.

Discusión

Los tumores malignos cerebrales, en especial el GBM, tienen muy mal pronóstico, el cual desafortunadamente no ha mejorado en décadas a pesar de los tratamientos actuales y que básicamente incluyen: sofisticados enfoques quirúrgicos, radioterapia y quimioterapia (Benítez, et al., 2008. Segovia y López-Ornelas, 2011). La capacidad de las células tumorales de infiltrarse en el parénquima cerebral, así como su aumentada resistencia a los quimioterapéuticos y a la radiación, impiden la eficacia de los tratamientos existentes.

La terapia génica ofrece un enfoque prometedor para el tratamiento de los tumores cerebrales, particularmente de los GBMs, por la capacidad de expresar genes terapéuticos en estos tumores que muy rara vez metastatizan.

Los vectores virales han sido los sistemas de transferencia génica más empleados para la expresión de transgenes en ensayos preclínicos y clínicos en el abordaje de este padecimiento y aunque parecen seguros, los resultados clínicos todavía no han generado una alternativa viable a los tratamientos actuales de los gliomas (Chiocca, et al., 2004. Asadi-Moghaddam y Chiocca, 2009).

El transgén terapéutico más comúnmente empleado para la terapia génica de gliomas, tanto experimentalmente como en pruebas clínicas, ha sido el HSV-TK (Pulkkanen y Yla-Herttuala, 2005. Hutterer, et al., 2006. Määttä, et al., 2009). El producto del gen HSV-TK transforma el profármaco Ganciclovir en un precursor que detiene la replicación del ADN e induce muerte celular. Interesantemente, la acción de este tipo de vectores se ve amplificada por un efecto “bystander”, el cual es causado por el transporte de metabolitos tóxicos a las células aledañas a través de las uniones estrechas (Dilber, et al., 1997. Touraine, et al., 1998. Asklund, et al., 2003). Este efecto aumenta la capacidad terapéutica; sin embargo, una limitante del sistema es que el nivel de comunicación

intracelular varía entre diferentes tumores y puede estar bloqueada en estadios avanzados de carcinogénesis (Yamasaki, 1991. Ishii-Morita, et al., 1997).

Existen diversos factores que deben ser considerados para lograr que los vectores virales infecten y logren expresar el transgén terapéutico en una cantidad suficiente de células tumorales y esto lleve a un efecto benéfico en los pacientes. Por ejemplo, las barreras físicas y la respuesta inmune inhiben la distribución del vector viral. Por otro lado, la corta vida media de algunos virus, como los retrovirus, también afectan su capacidad terapéutica (Kyritsis, et al., 2009. Sack y Herzog, 2009). También, los virus se difunden pasivamente en el sitio donde son administrados y su inadecuada distribución y propagación dentro del tumor disminuyen su capacidad terapéutica (Kim, et al., 2008).

Los vectores virales son muy grandes en comparación con los agentes quimioterapéuticos (100 veces más grandes) y esto ocasiona que la distribución dentro del tumor sea muy limitada, así la distribución de estos vectores desde el sitio de inyección o desde la vasculatura se encuentra severamente restringida (Mok, et al., 2007. Chiocca, et al., 2004). La matriz extracelular también tiene un papel importante en la limitada distribución de los vectores virales en el tumor, y por esta razón, varios enfoques terapéuticos para modularla han sido propuestos (McKee, et al., 2006. Yun, 2008).

Otra estrategia para lograr una distribución más completa y homogénea de agentes terapéuticos, es el uso de moléculas solubles que puedan ser liberadas por parte de las células que la expresan (Jeong, et al., 2009) y de este manera aumentar la difusión de agentes terapéuticos dentro del tumor, mejorando así el efecto benéfico del tratamiento.

Gas1 es una proteína que induce detención del ciclo celular y apoptosis en diferentes tumores (Kokkinakis, et al., 2006. Gobeil, et al., 2008. Zhao, et al., 2009), incluyendo líneas celulares de glioma y gliomas primarios humanos (Zamorano, et al.,

2003, 2004. Benítez, et al., 2007. Domínguez-Monzón, et al., 2009). Una serie de análisis bioinformáticos, revelaron homología estructural entre Gas1 y los GFR α s (Schueler-Furman, et al., 2006). Con base en esta información, posteriormente se demostró que los efectos de Gas1, es decir, arresto del ciclo celular e inducción a la apoptosis, son causados por la capacidad de la proteína de inhibir la vía de señalización intracelular mediada por GDNF, mecanismo consistente con el efecto inductor proliferativo de GDNF en gliomas (Wiesenhofer, et al., 2000. López-Ramírez, et al., 2008. Domínguez-Monzón, et al., 2009. Zarco, et al., 2012).

Estructuralmente, Gas1 posee un ancla GPI que la une a la membrana celular, pero existen reportes que indican que el dominio carboxilo terminal no es necesario para inducir arresto celular por parte de esta molécula y que una forma soluble de la misma es activa (Ruaro, et al., 2000. Stebel, et al., 2000). Estos datos permitieron hipotetizar que una forma soluble y secretable de Gas1 podría detener el ciclo celular e inducir apoptosis en células que expresen este transgén, pero también en células vecinas que no la expresan, amplificando así su efecto antitumoral. Para obtener esta forma secretable de Gas1, en este proyecto se generaron formas truncadas de la proteína, las cuales no tenían la secuencia consenso para el ancla GPI, así estas formas de Gas1 podrían ser secretadas hacia células tumorales (Yang, et al., 2004. Virtanen, et al., 2005. Orlean, et al., 2008). Los efectos autocrinos y paracrinos de Gas1 podrían significativamente aumentar su uso terapéutico, permitiendo la difusión y distribución de la molécula lejos de la célula productora.

Para alcanzar este objetivo, se generaron lentivirus con la información de una forma truncada de Gas1 (tGas1) y se demostró que las células C6 infectadas liberaban una forma soluble que podía inducir detención del ciclo celular y apoptosis cuando era transferida a cultivos independientes de células de GBM, C6. Además, la inyección intratumoral del lentivirus con tGas1 inhibió el crecimiento de células C6 inoculadas en el flanco de ratones desnudos. Por otro lado, también se observó una disminución en el

crecimiento del tumor cuando una mezcla de células C6 no infectadas y células C6 establemente infectadas, con un lentivirus con tGas1 y otro lentivirus con un elemento represor de la expresión regulado por Tetraciclina, fue inoculada en el flanco de ratones desnudos y que posteriormente fueron tratados con Tetraciclina, en comparación con otros ratones que tuvieron el mismo protocolo pero que no recibieron Tetraciclina. Este experimento permitió demostrar que se obtuvo un sistema regulable que funcionaba adecuadamente *in vivo* y que tGas1 conservaba su efecto antitumoral. Notablemente, el sistema diseñado de expresión regulable no presentó una expresión basal en la ausencia de Tetraciclina, lo que fue corroborado *in vitro e in vivo*, siendo esto de vital importancia debido a que algunos sistemas de esta índole presentan este escape o “fuga” (Benabdellah, et al., 2011).

Existen reportes que indican que moléculas solubles apoptogénicas, como S-TRAIL (Ligando Inductor de Apoptosis Relacionado al Factor de Necrosis Tumoral, en su forma Secretable), aplicadas en gliomas son efectivas reduciendo el crecimiento del tumor (Kim, et al., 2004. Hingtgen, et al., 2008. Menon, et al., 2009). Así, una forma relevante de aplicación es mediante la inyección de células productoras de tGas1 dentro del tumor. Una posible fuente de estas células son del mismo tumor u otras células somáticas del mismo paciente, o de diferente fuente, así la proteína secretable puede inhibir el crecimiento del tumor, y en el caso de aplicar células tumorales, mediante el uso de genes suicidas, se podría matar a las células genéticamente modificadas e incrementar la seguridad del sistema (Kosaka, et al., 2012).

La capacidad de regular la producción y liberación de la molécula terapéutica facilita un control en el tratamiento y más aún si las células productoras pueden ser marcadas y monitoreadas en el paciente y localizadas cuando infiltren el tumor. Como un primer acercamiento a esta estrategia, se inyectó una mezcla de células C6 y células C6 estables en ratones desnudos y se determinó el efecto en el crecimiento del tumor con la

administración de Tetraciclina. Este experimento demostró que es factible la regulación de la expresión de tGas1 en un modelo *in vivo* de GBM.

Continuando con el estudio de los efectos antitumorales de tGas1, se implementó un sistema de expresión regulada por tetraciclina donde CTNs fueron genéticamente modificadas, esto con la finalidad de emplearlas como un transporte de la molécula terapéutica hacia GBMs implantados en ratones desnudos, dado que presentan un tropismo innato hacia estos tumores (Aboody, et al., 2000). Si bien, no se conocen a fondo los mecanismos moleculares por los cuales existe esta quimiotaxis, existe evidencia que indica que los GBMs liberan quimiocinas, principalmente factores de crecimiento y de estos últimos los más importantes son el EGF, el Factor de Crecimiento de Hepatocitos, HGF y el VEGF (Heese, et al., 2005. Kendall, et al, 2008, Díaz-Coránguez, et al., 2013).

Los resultados obtenidos en este campo, muestran que las CTNs implantadas en un hemisferio cerebral migran hacia un GBM previamente implantado en el hemisferio cerebral contralateral y que dichas células pueden servir como vehículo de una forma regulable de tGas1. Interesantemente, se observó que un lapso de 7 días es tiempo suficiente para que la mayoría de las CTNs migren de un hemisferio a otro, distancia de 4 mm, este dato es consistente con otros estudios que refieren el mismo lapso de tiempo (Aboody, et al., 2000. Shah, et al., 2008). Importantemente, se observó que tGas1 al ser transportado por las CTNs y liberado de manera regulada, conserva su efecto antitumoral, pero que también mejora la supervivencia y el estado general en los ratones con un GBM implantado, lo cuales son indicadores de mejoría en la enfermedad.

Por otra parte, estos experimentos también revelaron que la Tetraciclina, a la concentración empleada en este estudio, no tiene un efecto antitumoral en un modelo *in vivo* e intracraneal de GBM, algo que contrasta con estudios que refieren que si posee dicho efecto (Frazier, et al., 2003. Markovic, et al., 2011). También, se observó que el uso de las CTNs por si mismas no posee un efecto antitumoral, algo que es importante, debido

a que existe una gran controversia sobre este punto; diversos reportes indican un efecto antitumoral de las CTNs (Kim, et al., 2006. Reitz, et al., 2012. Swartling, et al., 2013), pero otros estudios reportan un efecto carcinogénico (Liu, et al., 2010. Park, et al., 2010. Binello y Germano, 2012). Los resultados del proyecto apoyan la idea de que dichas células no inducen ninguno de los dos efectos, algo reportado por varios grupos de investigación (De Filippis, et al., 2007 y 2008. Rota, et al., 2010).

Otro hallazgo interesante fue el hecho de observar CTNs en el sitio de la lesión generada por su inoculación, dato que es congruente con otros estudios que refieren que las CTNs también pueden migrar a zonas de lesión cerebral, pero la quimiotaxis es con una fuerza mayor hacia un tumor (Hoehn, et al., 2002. Modo, et al., 2004. Schmidt, et al., 2005). Dada esta migración, varios autores también plantean el uso de estas células para transportar moléculas terapéuticas a sitios de lesión cerebral generados por isquemias (Rosenblum, et al., 2012) o por enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (Bjugstad, et al., 2008. Gonzalo-Gobernado, et al., 2009) o la enfermedad de Alzheimer (Abdel-Salam, 2011).

La observación de que las CTNs, inyectadas en el parénquima cerebral, migran hacia GBMs ubicados en el hemisferio cerebral contralateral y que pueden expresar una forma regulable de tGas1 y conservar su efecto antitumoral, da pie a continuar con estos experimentos. En un futuro se podrán realizar experimentos inyectando las CTNs, con la forma secretable y regulable de Gas1, de forma sistémica, por ejemplo intravenosamente, dado que también se ha visto que migran a través de esta vía (Aboody, et al., 2000. Zhang Z, et al., 2004. Díaz-Coránguez, et al., 2013). Todo esto pensando en una terapia a futuro en los pacientes, donde las CTNs podrían ser aplicadas vía arterial.

En este proyecto se demostró que la forma truncada de Gas1, producida por células de GBM infectadas o por líneas celulares de expresión regulable, puede ser secretada al medio e inducir apoptosis y arresto del ciclo celular en otras células que no

expresan el transgén terapéutico. Además la aplicación de un vector lentiviral o de células infectadas con este lentivirus, inhibe el crecimiento de tumores implantados en ratones.

Finalmente, las CTNs con la forma secretable y regulable de Gas1 migraron, de un hemisferio cerebral a otro, hacia un GBM implantado intracranealmente, dichas células expresaron tGas1 mediante la administración de tetraciclina, corroborado por RT-PCR y western blot, redujeron el volumen del tumor, aproximadamente en un 80%, y aumentaron la supervivencia de los animales tratados, en un 75%. Estos resultados apoyan el uso potencial de tGas1 como una terapia coadyuvante en el tratamiento de GBMs.

Conclusiones

- ❖ Una forma secretable de Gas1, tGas1, es funcional e induce apoptosis y detención del ciclo celular en una línea celular de glioblastoma.
- ❖ Los efectos de esta proteína son tanto autocrinos como paracrinos.
- ❖ La sobreexpresión de esta proteína en modelos *in vivo* de glioblastoma puede ser regulada y tiene un efecto antitumoral.
- ❖ La sobreexpresión de tGas1 en células troncales neurales de humano induce apoptosis y detención del ciclo celular.
- ❖ Las células troncales neurales de humano sirven como vehículo de una forma secretable y regulable de Gas1 hacia glioblastomas.
- ❖ La sobreexpresión de tGas1 por parte de las células troncales neurales, una vez que infiltraron el tumor, tiene un efecto antitumoral y mejora la supervivencia y el estado general en ratones desnudos inoculados con un glioblastoma.

Perspectivas

Los resultados obtenidos en este trabajo dan lugar a posteriores investigaciones enfocadas a tratar de extender el campo terapéutico de la proteína tGas1. Por un lado, resultaría interesante conocer más sobre los mecanismos moleculares y vías de señalización involucradas en el mecanismo de acción de Gas1, esto con la finalidad de identificar en que tipos de tumores funcionaría y si puede actuar en conjunción con otros agentes terapéuticos. También, es de vital importancia dilucidar el efecto de Gas1 durante el desarrollo embrionario y su relación con las células troncales neurales durante la neurogénesis, debido al efecto antitumoral que tiene sobre tumores de origen glial.

Por otro lado, en el campo de las CTNs como vehículo de una forma secretable y regulable de tGas1 hacia GBMs, nuevos experimentos pueden ser diseñados como son; la inyección de estas células vía torrente sanguíneo y que sigan transportando el transgén o, la administración de dosis más prolongadas de Tetraciclina, esperando así, aumentar el efecto antitumoral. También, para aumentar la seguridad del sistema, se abre la posibilidad de que a las CTNs genéticamente modificadas se les transfiera un gen suicida, como el gen de la Timidina cinasa o el de la citocina desaminasa.

Interesantemente, se pueden diseñar experimentos donde el objetivo sea incrementar la expresión de la proteína secretable, como son la construcción de vectores los cuales tengan la secuencia de un péptido señal de una molécula *per se* secretable, como la hormona del crecimiento, y la secuencia de tGas1.

Todas estas perspectivas tienen como objetivo la aplicación de tGas1 en el tratamiento coadyuvante de pacientes con GBMs en un futuro.

Bibliografía

- Abdel-Salam OM. 2011. Stem cell therapy for Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 4:459-85.
- Aboody KS, Brown A, Rainov NG, et al. 2000. Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc Natl Acad Sci*; 7:12846-51.
- Alemany, R., Balague, C., and Curiel, D. T. 2000. Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat. Biotechnol.* 18: 723 – 727.
- Allen, B. L., T. Tenzen, et al. 2007. The Hedgehog-binding proteins Gas1 and Cdo cooperate to positively regulate Shh signaling during mouse development. *Genes Dev.* 21(10): 1244-57.
- Allen, et al. 2011. Overlapping Roles and Collective Requirement for the Coreceptors GAS1, CDO, and BOC in SHH Pathway Function. *Developmental Cell.* 20(6): 775-787.
- Anson, D. S. 2004. The use of retroviral vectors for gene therapy-what are the risks? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vector-mediated gene delivery. *Genet Vaccines Ther.* 2(1): 9.
- Asadi-Moghaddam K, Chiocca EA. 2009. Gene-and viral-based therapies for brain tumors. *Neurotherapeutics*; 6: 547–557.
- Asklund T, Appelskog IB, Ammerpohl O, Langmoen IA, Dilber MS, Aints A et al. 2003. Gap junction-mediated bystander effect in primary cultures of human malignant gliomas with recombinant expression of the HSVtk gene. *Exp Cell Res*; 284: 185–195.
- Bachtarzi, H., M. Stevenson, et al. (2008). "Cancer gene therapy with targeted adenoviruses." *Expert Opin Drug Deliv* 5(11): 1231-40
- Baer JC, Freeman AA, Newlands ES, Watson AJ, Rafferty JA and Margison GP: 1993. Depletion of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase correlates with potentiation of temozolomide and CCNU toxicity in human tumour cells. *Br J Cancer.* 67: 1299-1302.
- Baranov, V. S. and A. N. Baranov (2000). "[Gene therapy of monogenic hereditary diseases. Duchenne myodystrophy]." *Vopr Med Khim* 46(3): 279-92.
- Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Colombo F, Palù G. 2009. HSV-TK/IL-2 gene therapy for glioblastoma multiforme. *Methods Mol Biol.* 542:529-49.
- Benabdellah K, Cobo M, Muñoz P, Toscano MG, Martin F. 2011. Development of an all-in-one lentiviral vector system based on the original TetR for the easy generation of Tet-ON cell lines. *PLoS One.* 8:e23734.
- Benítez JA, Arregui L, Vergara P, Segovia J. 2007. Targeted-simultaneous expression of Gas1 and p53 using a bicistronic adenoviral vector in gliomas. *Cancer Gene Ther.* 14: 836-46.
- Benítez JA, Domínguez-Monzón G, Segovia J. 2008. Conventional and gene therapy strategies for the treatment of brain tumors. *Curr Med Chem*; 15: 729–742.
- Benitez, J. A. and J. Segovia (2003). "Gene therapy targeting in the central nervous system." *Curr Gene Ther* 3(2): 127-45.
- Benitez, J. A., G. Dominguez-Monzon, et al. (2008). "Conventional and gene therapy strategies for the treatment of brain tumors." *Curr Med Chem* 15(8): 729-42.
- Biau S, Jin S, Fan CM. 2013. Gastrointestinal defects of the Gas1 mutant involve dysregulated Hedgehog and Ret signaling. *Biol Open.* 2:144-55.
- Biffi, A. and M. Cesani (2008). "Human hematopoietic stem cells in gene therapy: pre-clinical and clinical issues." *Curr Gene Ther* 8(2): 135-46.

- Biglari A, Bataille D, Naumann U, Weller M, Zirger J, Castro MG, Lowenstein PR. 2004. Effects of ectopic decorin in modulating intracranial glioma progression in vivo, in a rat syngeneic model. *Cancer Gene Ther.* 11(11):721-32.
- Binello E, Germano IM. 2012. Stem cells as therapeutic vehicles for the treatment of high-grade gliomas. *Neuro Oncol.* 3:256-65.
- Bjugstad KB, Teng YD, Redmond DE Jr, Elsworth JD, et al. 2008. Human neural stem cells migrate along the nigrostriatal pathway in a primate model of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2:362-9.
- Bouard, D., N. Alazard-Dany, et al. (2008). "Viral vectors: from virology to transgene expression." *Br J Pharmacol.*
- Boulaiz, H., J. A. Marchal, et al. (2005). "Non-viral and viral vectors for gene therapy." *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 51(1): 3-22.
- Brat DJ, Van Meir EG. 2004. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Lab Invest.* 84:397-405.
- Butowski N. 2010. Immunostimulants for malignant gliomas. *Neurosurg Clin N Am.* 21(1):53-65.
- CBTRUS 2010 statistical report: primary brain tumors in the United States, 2004-2006. Central Brain Tumor Registry of the United States, 2000-2004. (Accessed July 2, 2010, <http://www.cbtrus.org>).
- Cha S. 2006. Update on brain tumor imaging: from anatomy to physiology. *AJNR Am J Neuroradio.* 27:475-87.
- Chiocca EA, Abbed KM, Tatter S, Louis DN, Hochberg FH, Barker F, Kracher J, Grossman SA, Fisher JD, Carson K, Rosenblum M, Mikkelsen T, Olson J, Markert J, Rosenfeld S, Nabors LB, Brem S, Phuphanich S, Freeman S, Kaplan R, Zwiebel J. 2004. A phase I open-label, dose-escalation, multi-institutional trial of injection with an E1B-Attenuated adenovirus, ONYX-015, into the peritumoral region of recurrent malignant gliomas, in the adjuvant setting. *Mol Ther.* Nov; 10(5):958-66.
- Chiocca EA, Broaddus WC, Gillies GT, Visted T, Lamfers ML. 2004. Neurosurgical delivery of chemotherapeutics, targeted toxins, genetic and viral therapies in neuro-oncology. *J Neurooncol;* 69: 101–117.
- Curiel, D. T.; Douglas, J.T. *Vector Targeting for Therapeutic Gene Delivery*, Wiley-Liss, Inc.: NJ, U.S.A., 2002.
- Cutter, J. L., K. Kurozumi, et al. (2006). "Gene therapeutics: the future of brain tumor therapy?" *Expert Rev Anticancer Ther* 6(7): 1053-64.
- Danthinne, X., and Imperiale, M. J. 2000. Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Ther.* 7: 1707 – 1714.
- De Filippis L, Ferrari D, Rota Nodari L, et al., 2008. Immortalization of human neural stem cells with the c-myc mutant T58A. *PLoS One.* 10:e3310.
- De Filippis L, Lamorte G, Snyder EY, Malgaroli A, et al. 2007. A novel, immortal, and multipotent human neural stem cell line generating functional neurons and oligodendrocytes. *Stem Cells.* 9:2312-21.
- DeAngelis LM. 2001. Brain tumors. *N Engl J Med.* 11: 114-23.
- Díaz-Coránguez M, López-Ornelas A, Meráz-Cruz J, Puerta-Guardo H, et al. 2013. Transmigration of neural stem cells across the blood brain barrier induced by glioma cells. *PLOS ONE*: In press.

- Dilber MS, Abedi MR, Christensson B, Björkstrand B, Kidder GM, Naus CC et al. 1997. Gap junctions promote the bystander effect of herpes simplex virus thymidine kinase in vivo. *Cancer Res*; 15: 1523–1528.
- Dishart, K. L., L. Denby, et al. (2003). "Third-generation lentivirus vectors efficiently transduce and phenotypically modify vascular cells: implications for gene therapy." *J Mol Cell Cardiol* 35(7): 739-48.
- Domínguez-Monzón G, Benítez JA, Vergara P, Lorenzana R, Segovia J. 2009. Gas1 inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human primary gliomas in the absence of Shh. *Int J Dev Neurosci*. 27: 305-13.
- Dominguez-Monzon, Gonzalez-Ramirez, Segovia. 2011. Molecular Mechanisms of Action of Gas1 and its Possible Therapeutic Applications. *Current Signal Transduction Therapy* 6(1): 106-112.
- Edick MJ et al. 2005. Lymphoid gene expression as a predictor of risk of secondary brain tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 42: 107–116
- Ehrhardt, A., R. Haase, et al. (2008). "Episomal vectors for gene therapy." *Curr Gene Ther* 8(3): 147-61.
- Evdokiou A, Cowled PA. 1998. Tumor-suppressive activity of the growth arrest-specific gene GAS1 in human tumor cell lines. *Int J Cancer*. 75:568-77.
- Facchetti A, Ranza E, Nano R. 2008. Proliferation and programmed cell death: role of p53 protein in high and low grade astrocytoma. *Anticancer Res*. 28(1A):15-9.
- Forsyth PA, Posner JB. 1993. Headaches in patients with brain tumors: a study of 111 patients. *Neurology*. 43: 1678-83.
- Frazier JL, Wang PP, Case D, et al. 2003. Local delivery of minocycline and systemic BCNU have synergistic activity in the treatment of intracranial glioma. *J Neurooncol*; 643:203-9.
- Germano IM, Fable J, Gultekin SH, Silvers A. 2003. Adenovirus/herpes simplex-thymidine kinase/ganciclovir complex: preliminary results of a phase I trial in patients with recurrent malignant gliomas. *J Neurooncol*. 65(3):279-89.
- Gobeil S, Zhu X, Doillon CJ, Green MR. 2008. A genome-wide shRNA screen identifies GAS1 as a novel melanoma metastasis suppressor gene. *Genes Dev*. 22: 2932-40.
- Gonzalo-Gobernado R, Reimers D, Herranz AS, Díaz-Gil JJ, et al. 2009. Mobilization of neural stem cells and generation of new neurons in 6-OHDA-lesioned rats by intracerebroventricular infusion of liver growth factor. *J Histochem Cytochem*. 5:491-502.
- Grimm, D., J. S. Lee, et al. (2008). "In vitro and in vivo gene therapy vector evolution via multispecies interbreeding and retargeting of adeno-associated viruses." *J Virol* 82(12): 5887-911.
- Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, et al. 2008. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest*. 118:3132-3142.
- Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, et al. 2003. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*. 348:255-256.
- Hamel W, Westphal M. 2003. Gene therapy of gliomas. *Acta Neurochir Suppl*. 88:125-35.
- Harrow S, Papanastassiou V, Harland J, Mabbs R, Petty R, Fraser M, Hadley D, Patterson J, Brown SM, Rampling R. 2004. HSV1716 injection into the brain adjacent to tumour following surgical resection of high-grade glioma: safety data and long-term survival. *Gene Ther*. 11(22):1648-58
- Harsh GR, Deisboeck TS, Louis DN, Hilton J, Colvin M, Silver JS, Qureshi NH, Kracher J, Finkelstein D, Chiocca EA, Hochberg FH. 2000. Thymidine kinase activation of ganciclovir in

- recurrent malignant gliomas: a gene-marking and neuropathological study. *J Neurosurg.* 92(5):804-11.
- Hatinen T, Holm L, Airaksinen MS (2007) Loss of neurturin in frog—comparative genomics study of GDNF family ligand-receptor pairs. *Mol Cell Neurosci* 34: 155–167.
 - Heese O, Disko A, Zirkel D, Westphal M, Lamszus K. 2005. Neural stem cell migration toward gliomas in vitro. *Neuro Oncol.* 4:476-84.
 - Hingtgen S, Ren X, Terwilliger E, Classon M, Weissleder R, Shah K. 2008. Targeting multiple pathways in gliomas with stem cell and viral delivered S-TRAIL and Temozolomide. *Mol Cancer Ther.* 7: 3575-85.
 - Hirabayashi Y, Gotoh Y. 2010 Epigenetic control of neural precursor cell fate during development. *Nat Rev Neurosci.* 11(6):377-88.
 - Hoehn M, Küstermann E, Blunk J, Wiedermann D, et al, 2002. Monitoring of implanted stem cell migration in vivo: a highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 25:16267-72.
 - Howe SJ, Mansour MR, Schwarzwaelder K, et al. 2008. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J Clin Invest.* 118:3143-3150.
 - Hutterer M, Gunsilius E, Stockhammer G. 2006. Molecular therapies for malignant gliomas. *Wien Med Wochenschr;* 156: 351–363.
 - Idbaih A, Marie Y, Lucchesi C, Pierron G, Manie E, Raynal V, et al. BAC array CGH distinguishes mutually exclusive alterations that define clinicogenetic subtypes of gliomas. *Int J Cancer* 2008; 122(8):1778-86.
 - Immonen, A., et al. 2004. AdvHSV-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomised, controlled study. *Mol. Ther.* 10: 967 – 972.
 - Inskip PD, Tarone RE, Hatch EE, Wilcosky TC, Shapiro WR, Selker RG, et al. 2001. *N Engl J Med.* Cellular-telephone use and brain tumors. 11(2):79-86
 - Ishii-Morita H, Agbaria R, Mullen CA, Hirano H, Koeplin DA, Ram Z et al. 1997. Mechanism of 'bystander effect' killing in the herpes simplex thymidine kinase gene therapy model of cancer treatment. *Gene Ther;* 4: 244–251.
 - Izquierdo M, Martín V, de Felipe P, Izquierdo JM, Pérez-Higueras A, Cortés ML, Paz JF, Isla A, Blázquez MG. 1996. Human malignant brain tumor response to herpes simplex thymidine kinase (HSVtk)/ganciclovir gene therapy. *Gene Ther.* 3(6):491-5.
 - James CD, Carlbom E, Nordenskjöld M, Collins VP, Cavenee WK. 1989. Mitotic recombination of chromosome 17 in astrocytomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:2858-2862.
 - Jeong M, Kwon YS, Park SH, Kim CY, Jeun SS, Song KW et al. 2009. Possible novel therapy for malignant gliomas with secretable trimeric TRAIL. *PLoS One;* 4: e4545.
 - Kanerva, A., and Hemminki, A. 2004. Modified adenoviruses for cancer gene therapy. *Int. J. Cancer.* 110: 475 – 480.
 - Karamouzis, M. V., A. Argiris, et al. (2007). "Clinical applications of gene therapy in head and neck cancer." *Curr Gene Ther* 7(6): 446-57.
 - Kay, M. A., Glorioso, J. C., and Naldini, L. 2001. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat. Med.* 7: 33 – 40.
 - Kendall, S. E., J. Najbauer, et al. (2008). "Neural stem cell targeting of glioma is dependent on phosphoinositide 3-kinase signaling." *Stem Cells* 26(6): 1575-86.
 - Kim MH, Billiar TR, Seol DW. 2004. The secretable form of trimeric TRAIL, a potent inducer of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 321: 930-5.

- Kim SK, Kim SU, Park IH, Bang JH, et al. 2006. Human neural stem cells target experimental intracranial medulloblastoma and deliver a therapeutic gene leading to tumor regression. *Clin Cancer Res.* 12: 5550-6.
- Kim SM, Lim JY, Park SI, Jeong CH, Oh JH, Jeong M, et al. 2008. Gene therapy using TRAIL-secreting human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells against intracranial glioma. *Cancer Res.* 68: 9614-23.
- Kokkinakis DM, Brickner AG, Kirkwood JM, Liu X, Goldwasser JE, Kastrama A et al. 2006. Mitotic arrest, apoptosis, and sensitization to chemotherapy of melanomas by methionine deprivation stress. *Mol Cancer Res;* 4: 575–589.
- Kosaka H, Ichikawa T, Kurozumi K, Kambara H, et al. 2012. Therapeutic effect of suicide gene-transferred mesenchymal stem cells in a rat model of glioma. *Cancer Gene Ther.* 8:572-8.
- Kyritsis AP, Bondy ML, Rao JS, Sioka C. 2010. Inherited predisposition to glioma. *Neuro Oncol.* 12(1):104-13.
- Kyritsis AP, Sioka C, Rao JS. 2009. Viruses, gene therapy and stem cells for the treatment of human glioma. *Cancer Gene Ther;* 16: 741–752.
- Landgren H, Curtis MA. 2010. Locating and labeling neural stem cells in the brain. *J Cell Physiol.* Jul 23. [Epub ahead of print]
- Lara E, Beltrán JQ, Segovia J, Gutiérrez R. 2012. Granule cells born in the adult rat hippocampus can regulate the expression of GABAergic markers. *Exp Neurol.* 237(1):134-41.
- Le Doux. 2008. Production and in Vivo Applications of Gene Transfer Vectors. *Gene Therapy Protocols 1.* Humana press.
- Lee CS, Buttitta L, Fan CM. 2001. Evidence that the WNT-inducible growth arrest-specific gene 1 encodes an antagonist of sonic hedgehog signaling in the somite. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 25(20):11347-52.
- Lee, C. S. and C. M. Fan 2001. Embryonic expression patterns of the mouse and chick Gas1 genes. *Mech Dev.* 101(1-2): 293-7.
- Libermann TA, Nusbaum HR, Razon N, et al. 1985. Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature.* 313:144-147.
- Liu HK, Wang Y, Belz T, Bock D, et al. 2010. The nuclear receptor tailless induces long-term neural stem cell expansion and brain tumor initiation. *Genes Dev;* 7 :683-95.
- Liu, Y., N. R. May, et al. 2001. Growth arrest specific gene 1 is a positive growth regulator for the cerebellum. *Dev Biol.* 236(1): 30-45.
- Logan GJ, Alexander IE. 2012. Adeno-associated virus vectors: immunobiology and potential use for immune modulation. *Curr Gene Ther.* 12(4):333-43.
- López-Ornelas A, Mejía-Castillo T, Vergara P, Segovia J. 2011. Lentiviral transfer of an inducible transgene expressing a soluble form of Gas1 causes glioma cell arrest, apoptosis and inhibits tumor growth. *Cancer Gene Ther.* 2:87-99.
- López-Ramirez, M. A., G. Dominguez-Monzon, et al. 2008. Gas1 reduces Ret tyrosine 1062 phosphorylation and alters GDNF-mediated intracellular signaling. *Int J Dev Neurosci.* 26(5): 497-503.
- Lu C, Shervington A. 2008. Chemoresistance in gliomas. *Mol Cell Biochem.* 312(1-2):71-80.
- Määttä AM, Samaranyake H, Pikkarainen J, Wirth T, Ylä-Herttuala S. 2009. Adenovirus mediated herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir gene therapy for resectable malignant glioma. *Curr Gene Ther;* 9: 356–367.

- Markert JM, Medlock MD, Rabkin SD, Gillespie GY, Todo T, Hunter WD, Palmer CA, Feigenbaum F, Tornatore C, Tufaro F, Martuza RL. 2000. Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene Ther.* 7(10):867-74.
- Markovic DS, Vinnakota K, van Rooijen N, et al. 2011. Minocycline reduces glioma expansion and invasion by attenuating microglial MT1-MMP expression. *Brain Behav Immun.* 25:624-8. *J Neurooncol.* 64(3):203-9.
- Martinelli, D. C. and C. M. Fan. 2007. Gas1 extends the range of Hedgehog action by facilitating its signaling. *Genes Dev.* 21(10): 1231-43.
- Martinelli, D. C. and C. M. Fan. 2007. The role of Gas1 in embryonic development and its implications for human disease. *Cell Cycle.* 6(21): 2650-5.
- Martinez-Fong D, Bannon MJ, Trudeau LE, Gonzalez-Barrios JA, Arango-Rodriguez ML, et al. 2012. NTS-Polyplex: a potential nanocarrier for neurotrophic therapy of Parkinson's disease. *Nanomedicine.* 7:1052-69.
- Matthew H Porteus, Jon P Connelly, and Shondra M Pruet. 2006. A Look to Future Directions in Gene Therapy Research for Monogenic Diseases. *PLoS Genet.* 2(9): e133.
- McKee TD, Grandi P, Mok W, Alexandrakis G, Insin N, Zimmer JP et al. 2006. Degradation of fibrillar collagen in a human melanoma xenograft improves the efficacy of an oncolytic herpes simplex virus vector. *Cancer Res*; 66: 2509–2513.
- Meng Q, Xu J, Goldberg ID, Rosen EM, Greenwald RA, Fan S. 2000. Influence of chemically modified tetracyclines on proliferation, invasion and migration properties of MDA-MB-468 human breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis.* 18(2):139-46.
- Meng, R. D. and W. S. El-Deiry (1998). "Tumor suppressor gene therapy for cancer: from the bench to the clinic." *Drug Resist Updat* 1(3): 205-10
- Menon LG, Kelly K, Yang HW, Kim SK, Black PM, Carroll RS. 2009. Human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells expressing S-TRAIL as a cellular delivery vehicle for human glioma therapy. *Stem Cells.* 27: 2320-30.
- Miller, A. D. (2001). "Production of retroviral vectors." *Curr Protoc Hum Genet Chapter 12: Unit 12 5.*
- Minniti G, Muni R, Lanzetta G, Marchetti P, Enrici RM. 2009. Chemotherapy for glioblastoma: current treatment and future perspectives for cytotoxic and targeted agents.; *Anticancer Res.* 29(12):5171-84
- Modo M, Mellodew K, Cash D, Fraser SE, et al. 2004. Mapping transplanted stem cell migration after a stroke: a serial, in vivo magnetic resonance imaging study. *Neuroimage.* 1:311-7.
- Mok W, Boucher Y, Jain RK. 2007 Matrix metalloproteinases-1 and -8 improve the distribution and efficacy of an oncolytic virus. *Cancer Res*; 67: 10664–10668.
- Morsy MA, Caskey CT. 1999. Expanded-capacity adenoviral vectors--the helper-dependent vectors. *Mol Med Today*; 5: 18-24.
- Morsy MA, Gu M, Motzel S, Zhao J, Lin J, Su Q, et al. 1998. An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 95: 7866-7871.
- Muller, F. J., E. Y. Snyder, et al. 2006. Gene therapy: can neural stem cells deliver? *Nat Rev Neurosci.* 7(1): 75-84.
- Natsume A, Yoshida J. 2008. Gene therapy for high-grade glioma: current approaches and future directions. *Cell Adh Migr.* 2(3):186-91.
- Ohgaki H and Kleihues P. 2005. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol (Berl).* 109: 93–108.

- Ohgaki H. 2009. Epidemiology of brain tumors. *Methods Mol Biol.* 472:323-42.
- Okada H, Lieberman FS, Edington HD, Witham TF, Wargo MJ, Cai Q, Elder EH, Whiteside TL, Schold SC Jr, Pollack IF. 2003. Autologous glioma cell vaccine admixed with interleukin-4 gene transfected fibroblasts in the treatment of recurrent glioblastoma: preliminary observations in a patient with a favorable response to therapy. *J Neurooncol.* 64(1-2):13-20.
- Orlean P, Menon AK. Thematic review series: lipid posttranslational modifications. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycopospholipids. *Lipid Res* 2008; 48: 993–1011.
- Papanastassiou V, Rampling R, Fraser M, Petty R, Hadley D, Nicoll J, Harland J, Mabbs R, Brown M. 2002. The potential for efficacy of the modified (ICP 34.5(-)) herpes simplex virus HSV1716 following intratumoural injection into human malignant glioma: a proof of principle study. *Gene Ther.* 9(6):398-406.
- Park HJ, Kim JK, Jeon HM, Oh SY, et al. 2010. The neural stem cell fate determinant TLX promotes tumorigenesis and genesis of cells resembling glioma stem cells. *Mol Cells.* 5:403-8.
- Parney IF, Chang LJ, Farr-Jones MA, Hao C, Smylie M, Petruk KC. 2006. Technical hurdles in a pilot clinical trial of combined B7-2 and GM-CSF immunogene therapy for glioblastomas and melanomas. *J Neurooncol.* 78(1):71-80.
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. 2008. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 321:1807-1812.
- Paxinos G, Watson C. Keith B., Franklin J. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.* Second Edition. Gulf Professional Publishing. 2004.
- Pineda-Alvarez DE, Roessler E, Hu P, Srivastava K, Solomon BD, et al. 2012. Missense substitutions in the GAS1 protein present in holoprosencephaly patients reduce the affinity for its ligand, SHH. *Hum Genet.* 2:301-10.
- Prados MD, McDermott M, Chang SM, Wilson CB, Fick J, Culver KW, Van Gilder J, Keles GE, Spence A, Berger M. 2003. Treatment of progressive or recurrent glioblastoma multiforme in adults with herpes simplex virus thymidine kinase gene vector-producer cells followed by intravenous ganciclovir administration: a phase I/II multi-institutional trial. *J Neurooncol.* 65(3):269-78.
- Pulkkanen KJ, Yla-Herttuala S. 2005. Gene therapy for malignant glioma: current clinical status. *Mol Ther.* 12(4):585-98.
- Rainov NG. 2000. A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme. *Hum Gene Ther.* 20(17):2389-401.
- Rainov, N. G., and Ren, H. 2003. Clinical trials with retrovirus mediated gene therapy—What have we learned? *J. Neurooncol.* 65: 227 – 236.
- Rainov, N. G., and Ren, H. 2003. Clinical trials with retrovirus mediated gene therapy—What have we learned? *J. Neurooncol.* 65: 227 – 236.
- Ram Z, Culver KW, Oshiro EM, Viola JJ, DeVroom HL, Otto E, Long Z, Chiang Y, McGarrity GJ, Muul LM, Katz D, Blaese RM, Oldfield EH. 1997. Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells. *Nat Med.* 3(12):1354-61
- Rampling R, Cruickshank G, Papanastassiou V, Nicoll J, Hadley D, Brennan D, Petty R, MacLean A, Harland J, McKie E, Mabbs R, Brown M. 2000. Toxicity evaluation of replication-competent herpes simplex virus (ICP 34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma. *Gene Ther.* 7(10):859-66.

- Reitz M, Demestre M, Sedlacik J, Meissner H, et al. 2012. Intranasal delivery of neural stem/progenitor cells: a noninvasive passage to target intracerebral glioma. *Stem Cells Transl Med.* 12:866-73.
- Ribeiro LA, Quezi RG, Nascimento A, Bertolacini CP, Richieri-Costa A. 2010. Holoprosencephaly and holoprosencephaly-like phenotype and GAS1 DNA sequence changes: Report of four Brazilian patients. *Am J Med Genet A.* 152A (7):1688-94.
- Robbins PD, Ghivizzani SC. (1998). Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol Ther.* 80(1):35-47.
- Romano, G., Michell, P., Pacilio, C., and Giordano, A. (2000). Latest developments in gene transfer technology: achievements, perspectives, and controversies over therapeutic applications. *Stem Cells.* 18: 19 – 39.
- Rosenblum S, Wang N, Smith TN, Pendharkar AV, et al. 2012. Timing of intra-arterial neural stem cell transplantation after hypoxia-ischemia influences cell engraftment, survival, and differentiation. *Stroke.* 6:1624-31.
- Rota Nodari L, Ferrari D, Giani F, Bossi M, et al. 2010. Long-term survival of human neural stem cells in the ischemic rat brain upon transient immunosuppression. *PLoS One.* 11:e14035.
- Ruaro, M. E., M. Stebel, et al. 2000. Analysis of the domain requirement in Gas1 growth suppressing activity. *FEBS Lett.* 481(2): 159-63.
- Sack BK, Herzog RW. 2009. Evading the immune response upon in vivo gene therapy with viral vectors. *Curr Opin Mol Ther;* 11: 493–503.
- Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. 2005. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med.* 25(8): 811-22.
- Sandmair AM, Loimas S, Puranen P, Immonen A, Kossila M, Puranen M, Hurskainen H, Tyynelä K, Turunen M, Vanninen R, Lehtolainen P, Paljärvi L, Johansson R, Vapalahti M, Ylä-Herttuala S. 2000. Thymidine kinase gene therapy for human malignant glioma, using replication-deficient retroviruses or adenoviruses. *Hum Gene Ther.* 1(16):2197-205.
- Sandmair, A. M., et al. 2000. Thymidine kinase gene therapy for human malignant glioma, using replication-deficient retroviruses or adenoviruses. *Hum. Gene Ther.* 11: 2197 – 2205.
- Schmidt NO, Przylecki W, Yang W, Ziu M, et al. 2005. Brain tumor tropism of transplanted human neural stem cells is induced by vascular endothelial growth factor. *Neoplasia.* 6:623-9.
- Schneider C, King RM, Philipson L. 1988. Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell.* 9;(6):787-93.
- Schueler-Furman, O., E. Glick, et al. (2006). "Is GAS1 a co-receptor for the GDNF family of ligands?" *Trends Pharmacol Sci* 27(2): 72-7.
- Segovia J, López-Ornelas A. 2011. Recent Advances in Glioma Gene Therapy. *Brain Cancer, Tumor Targeting and Cervical Cancer.* Chapter 7: 201-216.
- Seppala, M., M. J. Depew, et al. 2007. Gas1 is a modifier for holoprosencephaly and genetically interacts with sonic hedgehog. *J Clin Invest.* 117(6): 1575-84.
- Shah K, Hingtgen S, Kasmieh R, et al. 2008. Bimodal viral vectors and in vivo imaging reveal the fate of human neural stem cells in experimental glioma model. *J Neurosci.* 23:4406-13.
- Shand N, Weber F, Mariani L, Bernstein M, Gianella-Borradori A, Long Z, Sorensen AG, Barbier N. 1999. A phase 1-2 clinical trial of gene therapy for recurrent glioblastoma multiforme by tumor transduction with the herpes simplex thymidine kinase gene followed by ganciclovir. GLI328 European-Canadian Study Group. *Hum Gene Ther.* 20(14):2325-35.

- Shirsat NV, Shaikh SA. 2003. Overexpression of the immediate early gene fra-1 inhibits proliferation, induces apoptosis, and reduces tumorigenicity of c6 glioma cells. *Exp Cell Res.* 15;(1):91-100.
- Smitt PS, Driesse M, Wolbers J, Kros M, Avezaat C. 2003. Treatment of relapsed malignant glioma with an adenoviral vector containing the herpes simplex thymidine kinase gene followed by ganciclovir. *Mol Ther.* 7(6):851-8.
- Stebel, M., P. Vatta, et al. 2000. The growth suppressing gas1 product is a GPI-linked protein. *FEBS Lett.* 481(2): 152-8.
- Stokoe D, Furnari FB. The PTEN/PI3 kinase pathway in human glioma. In: Van Meir EG, ed. *CNS Cancer: Models, Markers, Prognostic Factors, Targets and Therapeutic Approaches.* 1st ed. New York: Humana Press (Springer). 2009:315-357.
- Sulman EP, Guerrero M, Aldape K. Transcription profiling of brain tumors: tumor biology and treatment stratification. In: Van Meir EG, ed. *CNS Cancer: Models, Markers, Prognostic Factors, Targets and Therapeutic Approaches.* 1st ed. New York: Humana Press (Springer). 2009:529-552.
- Swartling FJ, Bolin S, Phillips JJ, Persson AI. 2013. Signals that regulate the oncogenic fate of neural stem cells and progenitors. *Exp Neurol.* 31 (Epub ahead of print).
- Touraine RL, Ishii-Morita H, Ramsey WJ, Blaese RM. 1998. The bystander effect in the HSVtk/ganciclovir system and its relationship to gap junctional communication. *Gene Ther;* 5: 1705–1711.
- Trask TW, Trask RP, Aguilar-Cordova E, Shine HD, Wyde PR, Goodman JC, Hamilton WJ, Rojas-Martinez A, Chen SH, Woo SL, Grossman RG. 2000. Phase I study of adenoviral delivery of the HSV-tk gene and ganciclovir administration in patients with current malignant brain tumors. *Mol Ther.* 1(2):195-203.
- Trojan J, Cloix JF, Ardourel MY, Chatel M, Anthony DD. 2007. Insulin-like growth factor type I biology and targeting in malignant gliomas. *Neuroscience.* 30(3):795-811.
- Uhl, M., M. Weiler, et al. 2005. Migratory neural stem cells for improved thymidine kinase-based gene therapy of malignant gliomas. *Biochem Biophys Res Commun.* 328(1): 125-9.
- Van Gool S, Maes W, Ardon H, Verschuere T, Van Cauter S, De Vleeschouwer S. 2009. Dendritic cell therapy of high-grade gliomas. *Brain Pathol.* 19(4):694-712.
- Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu HK, Wen PY, Olson JJ. 2010. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin.* 60(3):166-93.
- Vile RG, Tuszyński A, Castleden S. 1996. Retroviral vectors. From laboratory tools to molecular medicine. *Mol Biotechnol.* 5(2):139-58.
- Vile, R. G., and Russell, S. J. 1995. Retroviruses as vectors. *Br. Med. Bull.* 51: 12 -30
- Virtanen H, Yang J, Bernalov MM, Hiltunen JO, Leppänen VM, Kalkkinen N et al. 2005. The first cysteine-rich domain of the receptor GFRalpha1 stabilizes the binding of GDNF. *Biochem J;* 387: 817–824.
- Waehler, R., S. J. Russell, et al. (2007). "Engineering targeted viral vectors for gene therapy." *Nat Rev Genet* 8(8): 573-87.
- Wakabayashi T, Natsume A, Hashizume Y, Fujii M, Mizuno M, Yoshida J. 2008. A phase I clinical trial of interferon-beta gene therapy for high-grade glioma: novel findings from gene expression profiling and autopsy. *J Gene Med.* 10(4):329-39.
- Wen PY, Kesari S. 2008. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med.* 31(5): 492-507.
- Wiesenhofer B, Weis C, Humpel C. 2000. Glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) is a proliferation factor for rat C6 glioma cells: evidence from antisense experiments. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev;* 10: 311–321.

- Wu, L. and M. Sato (2003). "Integrated, molecular engineering approaches to develop prostate cancer gene therapy." *Curr Gene Ther* 3(5): 452-67.
- Yamasaki H. Aberrant expression and function of gap junctions during carcinogenesis. 1991. *Environ Health Perspect*; 93: 191–197.
- Yang J, Tiong J, Kennard M, Jefferies WA. 2004. Deletion of the GPI pre-anchor sequence in human p97—a general approach for generating the soluble form of GPI-linked proteins. *Protein Expr Purif*; 34: 28–48.
- Yin S, Van Meir EG. p53 pathway alterations in brain tumors. In: Van Meir EG, ed. *CNS Cancer: Models, Markers, Prognostic Factors, Targets and Therapeutic Approaches*. 1st ed. New York: Humana Press (Springer). 2009:283-314.
- Yun CO. 2008. Overcoming the extracellular matrix barrier to improve intratumoral spread and therapeutic potential of oncolytic virotherapy. *Curr Opin Mol Ther*; 10: 356–361.
- Zamorano A, Lamas M, Vergara P, Naranjo JR, Segovia J. 2003. Transcriptionally mediated gene targeting of Gas1 to glioma cells elicits growth arrest and apoptosis. *J Neurosci Res*. 71: 256-63.
- Zamorano A, Mellström B, Vergara P, Naranjo JR, Segovia J. 2004. Glial-specific retrovirally mediated gas1 gene expression induces glioma cell apoptosis and inhibits tumor growth in vivo. *Neurobiol Dis*. 5: 483-91.
- Zarco N, González-Ramírez R, et al. 2012. GAS1 induces cell death through an intrinsic apoptotic pathway. *Apoptosis*. 17(6):627-35.
- Zhang X, Zhang W, Cao WD, Cheng G, Zhang YQ. 2012. Glioblastoma multiforme: Molecular characterization and current treatment strategy (Review). *Exp Ther Med*. 1:9-14.
- Zhang Z, Jiang Q, Jiang F, Ding G, et al. 2004. In vivo magnetic resonance imaging tracks adult neural progenitor cell targeting of brain tumor. *Neuroimage*. 1:281-7.
- Zhao L, Pan Y, Gang Y, Wang H, Jin H, Tie J et al. 2009. Identification of GAS1 as an epirubicin resistance-related gene in human gastric cancer cells with a partially randomized small interfering RNA library. *Biol Chem*; 284: 26273–26285.
- Zhao S, Lin Y, Xu W, et al. 2009. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1 α . *Science*. 324:261-265.
- Zubler RH. (2006). Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells and gene therapy development. *Swiss Med Wkly* 23(49-50):795-9.